

**'n ONDERSOEK NA HIPERLIPIDEMIE-VEROORSAKENDE
MUTASIES EN HUL GEASSOSIEERDE HAPLOTYPES IN SUID-
AFRIKAANSE HIPERLIPIDEMIESE KLEURLINGE**

ODELL LOUBSER

TESIS INGELEWER TER GEDEELTELIKE VOLDOENING AAN DIE
VEREISTES VIR DIE GRAAD VAN MAGISTER IN MEDIESE
NATUURWETENSKAPPE (MENSGENETIKA)

STUDIELEIER: PROF HJ ODENDAAL

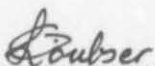
MEDE-STUDIELEIER: DR MJ KOTZE

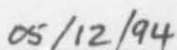
UNIVERSITEIT VAN STELLENBOSCH

DESEMBER 1994

VERKLARING

Ek die ondergetekende verklaar hiermee dat die werk in hierdie tesis vervat, my eie oorspronklike werk is wat nog nie vantevore in die geheel of gedeeltelik by enige ander universiteit ter verkryging van 'n graad voorgelê is nie.


.....
Handtekening


.....
Datum

UITTREKSEL

Koronêre hartsiekte (KHS), wat algemeen is onder Suid-Afrikaanse blankes, is toenemend besig om te manifesteer in die Kleurlingpopulasie van Suid-Afrika. Meer as 70% van Kleurlinge in die CRISIC I studie, wat onderneem is om die risikofaktore vir die ontwikkeling van KHS in die Kleurlinge van die Kaapse Skiereiland te bepaal, het serum cholesterolwaardes gehad wat 'n hoë risiko vir die ontwikkeling van KHS aandui.

Verhoogde plasma lae-digtheid lipoproteïen cholesterol- (LDL-C) vlakke is die algemeenste kenmerk van die siekte familiële hipercholesterolemie (FH), wat veroorsaak word deur mutasies in die lae-digtheid lipoproteïen (LDL) reseptor geen.

Die Kleurling studie-populasie is gesif vir die drie stigterverwante puntmutasies in die LDL reseptor geen, wat verantwoordelik is vir meer as 90% van FH-gevalle in die Afrikanerpopulasie van Suid-Afrika. Die voorkoms van die FH-Afrikaner mutasies is ondersoek in 31 FH heterosigote, asook 39 hiperlipidemiese Kleurlinge wat nie aan die kriteria voldoen het vir die insluiting in die FH heterosigotiese groep nie. Die FH-Afrikaner-1 (Asp₂₀₆→Glu, FH-1) en FH-Afrikaner-2 (Val₄₀₈→Met, FH-2) mutasies se voorkoms in die FH-groep was dieselfde, nl. 12.9% (4 individue), terwyl die FH-Afrikaner-3 (Asp₁₅₄→Asn, FH-3) mutasie afwesig was. Die drie FH-Afrikaner mutasies is nie opgespoor in die hiperlipidemiese groep van 39 individue nie. Haplotipe-analise in families met die FH-1 mutasie het getoon

dat die mutasie op dieselfde chromosomale agtergrond voorkom as wat voorheen in die Afrikaners beskryf is. In die FH-2 heterosigote was die mutasie geassosieer met 'n haplotipe wat by polimorfiese setels aan beide kante van die defek in ekson 9 verskil van die Afrikanerhaplotipe. Die resultate dui dus aan dat identiese LDL reseptor geen mutasies in die twee verskillende Suid-Afrikaanse populasiegroepe as gevolg van onafhanklike gebeure by 'n potensiële CpG mutasie-geneigde setel ontstaan het. Die kliniese effek van die FH-1 en FH-2 mutasies in die Kleurlingpasiente stem ooreen met wat reeds beskryf is in die Afrikaners.

'n Bekende 3 bp deleisie van die aminosuur Gly₁₉₇ (FH-Lithuania) is waargeneem in een individu (4.3%) van die 23 Kleurling FH heterosigote en in een individu van 90 hiperlipidemiese Kleurlinge (1.1%), by wie die FH-Afrikaner mutasies reeds uitgeskakel is, deur gebruik te maak van heterodupleks-analise. Uit 'n hiperlipidemiese groep van 66 Kleurlinge, waarvan PKR-produkte van ekson 4 van die LDL reseptor geen vir die eerste keer aan mutasie-analise onderwerp is, het een individu (1.5%) die FH-Lithuania mutasie getoon. In alle gevalle het die mutasie op dieselfde haplotipe voorgekom as wat beskryf is in Askenazi Jode. Die heterodupleksmetode was sensitief genoeg om die FH-1 mutasie te identifiseer, aangesien 5 individue met die mutasie opgespoor is in die 66 hiperlipidemiese Kleurlinge wat nog nie voorheen aan mutasie-analise onderwerp is nie.

'n Totaal van 22 FH heterosigote, negatief vir bg. mutasies, is gezif vir nuwe mutasies in ekson 4 van die LDL reseptor geen d.m.v. heterodupleks-analise en die enkelstring-konformasie-polimorfisme (ESKP) opsporingstegniek. In een pasiënt is 'n nuwe mutasie d.m.v. die ESKP tegniek geïdentifiseer. Die A na G puntmutasie by nukleotiedposisie 671 in ekson 4 van die LDL reseptor cDNA, lei tot die aminosuurverandering van aspartienuur na alanien by kodon 203 in die sisteïenryke ligandbindende gebied van die LDL reseptor. Aangesien die nuwe mutasie 'n *Hae* III restriksie-endonuklease setel skep, kan restriksie-endonuklease analyse van PCR-geamplifiseerde genomiese DNA die akkurate diagnose van hierdie sogenaamde FH-Tygerberg mutasie toelaat.

Die alleelfrekwensies van vier restriksie-fragment-lengte-polimorfismes (RFLP's) van die LDL reseptor geen is ondersoek in 17 FH heterosigote en 21 kontrole individue. 'n Statisties beduidende verhoging in die skaars alleel van die *Ava* II polimorfisme ($\chi^2 = 7.14$, $P < 0.01$) is waargeneem. Dit dui op populasie assosiasie van die skaars alleel van die *Ava* II polimorfisme met 'n geen wat FH veroorsaak. Die heterosigositeit- en PII waardes is vir elke RFLP setel bereken en daaruit het dit geblyk dat die *Sma* I setel die informatiefste sal wees in genetiese koppelingstudies, gevolg deur die *Ava* II en *Nco* I setels. Laasgenoemde drie setels is almal redelik informatief, terwyl die *Stu* I setel die minste informatief is van die vier RFLP setels.

In 2 FH heterosigote is 'n 478 bp delesie in ekson 18 van die LDL reseptor geen waargeneem. Een van hierdie pasiënte was heterosigoties vir die FH-1

mutasie. Die delesie word as 'n polimorfisme beskou, aangesien dit in die 3'-ongetransleerde gedeelte van die LDL reseptor geen voorkom. Dit mag moontlik in genetiese merkerstudies gebruik word.

Uit hierdie studie kan afgelei word dat die redelik informatiewe RFLP setels (*Sma* I, *Ava* II en *Nco* I), en die TA-herhalende-dinukleotiedloкус, ook redelik informatief, gekombineer moet word om FH indirek te diagnoseer in families waar die direkte molekulêre diagnose van FH, deur die aantoon van FH-verwante mutasies, nie moontlik is nie.

'n Beter molekulêre diagnostiese diens is nou moontlik vir die Kleurlingpopulasie, met 'n hoë risiko vir die ontwikkeling van koronêre hartsiekte, deur die kombinerings van die sifting vir FH-verwante mutasies met RFLP en dinukleotied-herhalende-polimorfisme studies.

ABSTRACT

Coronary heart disease (CHD), common among South African whites, is increasingly manifesting itself in the coloured population of South Africa. More than 70% of coloureds participating in the CRISIC I study, a study undertaken to investigate CHD risk factors in the coloureds of the Cape Peninsula, had serum cholesterol levels imparting CHD risk.

Increased levels of plasma low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) are the hallmark of the disease familial hypercholesterolemia (FH). The underlying molecular defect of FH consists of mutations in the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene.

The coloured study population was screened for the presence of the three founder related point mutations in the LDL receptor gene that account for more than 90% of FH cases in the Afrikaner population of South Africa. The prevalence of the FH Afrikaner mutations was determined in 31 FH heterozygotes and 39 hyperlipidemic coloureds. The 39 hyperlipidemic coloureds did not meet the criteria for heterozygous FH. The FH Afrikaner-1 (Asp₂₀₆→Glu, FH-1) and FH Afrikaner-2 (Val₄₀₈→Met, FH-2) mutations had the same prevalence, 12.9% (4 individuals), in the FH group. The FH Afrikaner-3 (Asp₁₅₄→Asn, FH-3) mutation was absent in the FH group. The three FH Afrikaner mutations were not detected in the hyperlipidemic group of 39 individuals. Haplotype analysis in the families with the FH-1 mutation showed that the chromosomal background of the mutation was compatible

with that described in the Afrikaner patients. In the FH-2 heterozygous patients the mutation was found on a haplotype that differed from the Afrikaner haplotype at polymorphic sites at both sides of the defect in exon 9. These results indicate that identical LDL-receptor gene mutations originated in two different South African population groups due to independent events at a potential CpG dinucleotide "hotspot". The clinical effects of the FH-1 and FH-2 mutations were the same as described in the Afrikaners.

Heteroduplex analysis detected a 3 bp deletion that causes deletion of amino acid Gly₁₉₇ (FH Lithuania) in one of 23 FH heterozygous coloured patients (4.3%) and in one individual of 90 hyperlipidemic coloureds (1.1%) already screened for the FH Afrikaner mutations, by means of heteroduplex analysis. A hyperlipidemic group of 66 coloureds, screened for the first time for mutations in exon 4 of the LDL-receptor gene by means of heteroduplex analysis, showed one individual (1.5%) with the FH Lithuania mutation. In all cases, the haplotype of the mutant allele was compatible with that described in Ashkenazi Jews. The heteroduplex screening method was sensitive enough to detect the FH-1 mutation, as 5 individuals of the group of 66 hyperlipidemic coloureds were found to have the FH-1 mutation.

A total of 22 FH heterozygous coloured patients, negative for the above mentioned mutations, were screened for new mutations in exon 4 of the LDL-receptor gene by means of the single-strand-conformation-polymorphism (SSCP) technique and the heteroduplex method. A new mutation, hitherto not described, was detected in one patient by means of the SSCP technique.

A point mutation (A to C) at nucleotide 671 in exon 4 of the LDL receptor cDNA results in an amino acid change from aspartic acid to alanine at residue 203 in the cysteine rich ligand binding domain of the LDL receptor. The mutation gives rise to an additional *Hae* III restriction site in the DNA of affected subjects. The accurate diagnosis of this so-called FH Tygerberg mutation in subjects with FH is possible now by means of the amplification of genomic DNA (using the polymerase chain reaction) and restriction enzyme analysis.

The allele frequencies of four restriction-fragment-length-polymorphisms (RFLP's) in the LDL-receptor gene were determined for 17 FH heterozygous patients and 21 control individuals. Statistical analysis indicated a significant rise in the frequency of the least frequent allele of the *Ava* II polymorphism ($\chi^2 = 7.14$, $P < 0.01$). This indicates population association of the allele with a gene that causes FH. The heterozygosities and PIC values of each RFLP site were determined, and these values disclosed that the *Sma* I site would be the most informative in genetic linkage studies, followed by the *Ava* II and *Nco* I sites. These three sites were all moderately polymorphic. The *Stu* I site was the least polymorphic and therefore would be the least informative of the four RFLP sites in genetic studies.

A 478 bp deletion in exon 18 of the LDL-receptor gene was detected in 2 FH heterozygous coloured patients. One of the two patients was heterozygous for the FH-1 mutation. This deletion is most likely a polymorphism as it was

detected in the 3'-nontranslated region of the LDL-receptor gene and therefore it may be used in genetic marker analysis.

This study suggests that the moderately informative RFLP sites (*Sma* I, *Ava* II and *Nco* I) must be combined with the TA dinucleotide repeat locus, also moderately informative, to indirectly diagnose FH in families where the direct molecular diagnosis of FH, by means of the detection of the FH associated mutations, is not possible.

A better molecular diagnostic service is now possible for the coloureds with a high risk for CHD by combining the screening for FH associated mutations with RFLP and dinucleotide repeat polymorphism studies.

Opgedra aan my ma, Lucille, en my man André

DANKBETUIGINGS

Ek wil graag die volgende persone en instansies opreg bedank vir hulle waardevolle bydraes tot hierdie navorsing.

Die **Kaapse Provinsiale Administrasie** vir die beskikbaarstelling van die nodige geriewe.

Die **Mediese Navorsingsraad (S.A.)** en die **Universiteit van Stellenbosch** vir die beskikbaarstelling van die nodige fasiliteite en vir finansiële ondersteuning.

Prof. H.J. Odendaal, my studieleier, vir die voorsiening van die geleentheid vir hierdie studie.

Dr. M.J. Kotze, my mede-studieleier, vir haar entoesiasme en leiding in hierdie studie.

Dr. C.J.J. Oosthuizen en **Dr. M. P. Marx** vir administratiewe hulp en raad.

Mej. J.J. Grobbelaar, **Dr. G. de Jong** en **Dr. J.A. Kriek** vir die versameling van bloedmonsters.

Drr. K. Steyn, **F. Maritz**, **A.D. Marais** en **Prof. D.R. van der Westhuyzen** vir die insluiting in hierdie studie van pasiënte wat die lipiedklinieke van Tygerberg Hospitaal en Groote Schuur Hospitaal bygewoon het.

Mnr. R. Titus vir hulp met fotografiese werk.

Mev. E. Smit, **Mev. L. Theart**, **Mev. L. Grobbelaar** en **Mej. L. du Plessis** vir waardevolle assistensie.

Mnr. A.V. Peeters vir raad en **Mnr. J. S. Herbert** vir hulp met statistiese ontiedings en beskikbaarstelling van DNA van die kontrole populasie.

Mev. M. Callis van die Universiteit van die Oranje-Vrystaat, Bloemfontein, vir die beskikbaarstelling van die H4A, GZ-7 en GZ-8 voorvoeders.

Die **personeel van die Departement Menslike Genetika** vir hulle belangstelling en bystand.

My man, André, vir waardevolle hulp met rekenaarprogrammatuur en volgehoue aanmoediging.

My Hemelse Vader sonder wie niks moontlik sou wees nie.

INHOUDSOPGAWE

1. INLEIDING	18
1.1. HIPERLIPIDEMIESE VEROORSAKENDE SIEKTES	18
1.2. FAMILIËLE HIPERCHOLESTEROLEMIE	19
1.3. DIE STRUKTUUR VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN	21
1.4. MUTASIES IN DIE LDL RESEPTOR GEEN	25
1.4.1. Funksionele klasse van mutasies	25
1.4.2. Mutasies in die promotorstreek	28
1.4.3. Delesies en Insersties	28
1.5. MOLEKULÊRE METODES VIR DIE OPSPORING VAN MUTASIES	29
1.5.1. Polimerase ketting reaksie	30
1.5.2. Die heterodupleksmetode	32
1.5.3. Die enkelstring-konformasie-polimorfisme (ESKP) opsporingstechniek	33
1.5.4. Die Southern-kladtegniek	34
1.5.5. DNA volgorde bepaling	35
1.5.6. Die amplifikasie-inhiberende-mutasie-sisteem (AIMS)	35
1.6. POLIMORFISMES IN DIE LDL RESEPTOR GEEN	36
1.6.1. Restriksie-fragment-lengte-polimorfismes (RFLP's)	36
1.6.2. Dinukleotied-herhalingspolimorfismes	39
1.6.3. Die bepaling van haplotipes	40
1.7. DIE DIAGNOSE VAN FH	41
1.8. DIE KLEURLINGE VAN SUID-AFRIKA EN FH	43
1.9. DOEL VAN STUDIE	45
2. MATERIAAL EN METODES	47
2.1. MATERIAAL	47
2.1.1. Pasiënte	47

2.1.2. Media en buffers	48
2.2. METODES	48
2.2.1. Lipiedbepalings	48
2.2.2. Voorbereiding van genomiese DNA	49
2.2.3. Polimerase ketting reaksie	51
2.2.4. Mutasie-analise van PKR-produkte	53
2.2.5. Restriksie-fragment-lengte-polimorfisme (RFLP) studie	63
2.2.6. Statistiese berekeninge	65
2.2.7. Haplotipe studies	65
2.2.8. TA-herhalende-volgorde-polimorfisme studie	66
3. RESULTATE	68
3.1. MUTASIE-ANALISE VAN PKR-PRODUKTE	68
3.1.1. Sifting van die Kleurlingpopulasie vir die FH-Afrikaner-1, -2 en -3 mutasies deur gebruik te maak van die amplifikasie-inhiberende-mutasie-sisteem (AIMS)	68
3.1.2. Sifting vir bekende en nuwe mutasies in ekson 4 van die LDL reseptor geen deur heterodupleks-analise	70
3.1.3. Sifting van ekson 4 van die LDL reseptor geen vir onbekende mutasies met die enkelstring-konformasie-polimorfisme-metode (ESKP)	73
3.1.4. Sifting vir die 2.5 kb deleisie van eksone 7-8 in die LDL reseptor geen	79
3.2. KLINIESE DATA	80
3.3. RFLP STUDIE	81
3.3.1. Haplotipe studie in mutasie-positiewe FH pasiënte	83
3.3.2. Die bepaling van RFLP genotipes en alleelfrekwensies in die FH en kontrole populasies	85
3.3.3. Die identifikasie van 'n 478 bp deleisie in ekson 18 van die LDL reseptor geen	94
3.4. TA-HERHALENDE VOLGORDE POLIMORFISME STUDIE	99
4. BESPREKING EN TOEKOMSVERWAGTINGE	104
4.1. BESPREKING	104

<i>4.1.1. Mutasie-analise van PKR-produkte.....</i>	<i>105</i>
<i>4.1.2. RFLP studie.....</i>	<i>120</i>
<i>4.1.3. TA herhalende volgorde polimorfisme studie.....</i>	<i>128</i>
4.2. TOEKOMSVOORUITSIGTE.....	130
5. GEVOLGTREKKINGS	134
6. VERWYSINGS.....	139

AFKORTINGS

A	adenien
A ₂₆₀	absorbansie by 260 nm
AIMS	amplifikasie-inhiberende-mutasie-sisteem
bp	basispare
°C	grade celcius
C	sitosien
cDNA	komplimentêre DNA
Ci	Curie
dATP	deoksiadenosien trifosfaat
dCTP	deoksisitidien trifosfaat
dGTP	deoksiguanidien trifosfaat
dH ₂ O	gedistilleerde water
dl	desiliter
DNA	deoksiribonukleïensuur
dTTP	deoksitimidien trifosfaat
E	eenhede
EDTA	etileendiaminotetra-asynsuur
EGF	Epidermale groeifaktor
ER	endoplasmiese retikulum
ESKP	enkelstring-konformasie-polimorfisme
EtBr	ethidiumbromied
ETOH	etanol
FDB	familiële defektiewe apolipoproteïen B-100
FH	familiële hipercholesterolemie
G	guanien
gem	gemiddelde
GSH	Groote Schuur Hospitaal
HDL	hoë-digtheid lipoproteïen
j	jare
kb	kilobasispare
KHS	koronêre hartsiekte
LB* medium	bakteriese groeimedium
LDL	lae-digtheid lipoproteïen
m	manlik
M	mol per liter
mg	milligram
MgCl ₂	magnesiumchloried
ml	milli-liter
mM	millimolaar
mmol/L	millimol per liter
m/v	massa per volume
mRNA	boodskapper RNA
NaCl	natriumchloried
ng	nanogram

nm	nanometer
nr.	nommer
PII	polimorfiese informasie inhoud
PKR	polimerase ketting reaksie
pmol	pikomol
RFLP	restriksie-fragment-lengte-polimorfisme
RNAse	ribonuklease
rpm	revolusies per minuut
SDS	natriumdodesielsulfaat
SSC*	soutbuffer
T	timien
TBE*	elektroforese buffer
TBH	Tygerberg Hospitaal
TC	totale cholesterol
TG	triglisieriede
tpm	tellings per minuut
Tris	Tris-(hidroksimetiel) aminometaan
UV	ultravioletlig
V	volt
v	vroulik
XMATA	xantomas
α	alpha
β	beta
γ	gamma
λ	lambda
μg	mikrogram
μl	mikroliter

* volledig beskryf in teks

1. INLEIDING

1.1. *Hiperlipidemiese veroorsakende siektes*

Koronêre hartsiekte (KHS) veroorsaak ongeveer die helfte van alle kardiovaskulêre sterftes (Utermann, 1990). In Amerika en baie verwesterde industriële lande is KHS die belangrikste oorsaak van mortaliteit. KHS word gewoonlik veroorsaak deur aterosklerose, die akkumulasie van onder meer lipiede in arteriële wande. Eerste-orde onafhanklike risikofaktore in die ontwikkeling van KHS sluit in hipercholesterolemie, die oormatige gebruik van sigarette en hipertensie (Dawber, 1980; Keys, 1980). Diabetis mellitus, stres en onaktiwiteit is belangrike tweede-orde risiko-faktore (Dawber, 1980; Keys, 1980).

Dit word algemeen aanvaar dat KHS 'n neiging toon om in sekere families te groepeer (Gertler & White, 1954; Thomas & Cohen, 1955; Slack & Evans, 1966). Die outosomaal dominante vorme van familiële hiperlipidemie is van die algemeenste genetiese siektes by die mens en word geassosieer met die vorming van vroeë KHS. Die huidige genetiese klassifikasie van dominante familiële hipercholesterolemie is gebaseer op die pionierswerk van Goldstein en medewerkers (1973). Drie monogeniese lipiedsiektes kan onderskei word op grond van verskillende verspreidingspatrone van plasma cholesterolwaardes en trigliseriedvlakke in verwante individue, nl. familiële hipercholesterolemie, familiële hipertrigliseridemie en familiële gekombineerde hiperlipidemie.

1.2. *Familiële hipercholesterolemie*

Familiële hipercholesterolemie (FH) is die beste voorbeeld van 'n monogeniese siekte waar die mutante geen beide hipercholesterolemie en aterosklerose veroorsaak. FH is een van die mees algemene enkelgeensiektes ter wêreld en word op 'n outosomaal dominante manier oorgeërf. In vergelyking met die ander monogeniese lipiedsiektes kan FH die maklikste gediagnoseer word op kliniese vlak. Die kriterium wat FH van die ander familiële hiperlipidemieë onderskei is die amper volledige uitdrukking van hipercholesterolemie in geaffekteerde kinders (Goldstein et al., 1973). FH word gekarakteriseer deur 'n lewenslange verhoging in die vlak van serum lae-digtheid lipoproteïen (LDL) cholesterol en normale trigliseriedvlakke (Goldstein et al., 1973; Brown & Goldstein, 1986; Goldstein & Brown, 1989). Verdere kenmerke sluit in die voorkoms van xantomas (vetneerslae in die vel en tendons) en vroeë aterosklerose (Brown & Goldstein, 1986; Goldstein & Brown, 1989).

FH word veroorsaak deur mutasies in die LDL reseptor geen (Goldstein & Brown, 1983). Die LDL reseptor is 'n seloppervlakte-glikoproteïen wat plasma LDL, die vernaamste cholesteroltransportproteïene, bind en tot binne-in selle vervoer deur die proses van reseptor-gemedieerde-endositose (Pastan & Willingham, 1983; Yamamoto et al., 1984). Binne die selle word die LDL afgebreek en word die cholesterol vrygestel vir gebruik in die sintese van membrane en steroïedhormone, asook vir die regulering van die uitdrukking

van seloppervlakte-reseptors d.m.v. terugvoerregulering (Yamamoto et al., 1984).

Die voorkoms van FH heterosigote is 1 uit 500 in die meeste populasies, terwyl die homosigote wat twee defektiewe gene oorgeërf het, voorkom teen 'n frekwensie van 1 uit 'n miljoen pasgebore babas (Goldstein & Brown, 1989).

In individue wat heterosigoties is vir 'n LDL reseptor mutasie, word net die helfte van die normale aantal funksionele reseptore op die seloppervlakte uitgedruk. Gevolglik vind binding, internalisering en afbreking van plasma LDL teen die helfte van die normale tempo plaas (Goldstein & Brown, 1989). Cholesterolvlakke by heterosigote varieer tussen 300 en 500 mg/dl met 'n gemiddelde van 340 mg/dl (Grundy, 1986; Goldstein & Brown, 1989). Simptomatiese KHS kom voor teen die gemiddelde ouderdom van 50 jaar by mans en 60 jaar by vroue (Goldstein & Brown, 1989), en word gerapporteer in 3-6% van relatief jong oorlewendes van hartaanvalle (Pattersson & Slack, 1972; Goldstein et al., 1973; Nikkilä & Aro, 1973).

By FH homosigote is die kliniese beeld baie erger as by FH heterosigote en die plasma konsentrasie van LDL-cholesterol is ook baie hoër (Hobbs et al., 1992). Min tot geen funksionele reseptore word uitgedruk op die seloppervlakte en totale plasma cholesterolvlakke varieer tussen 600 en 1200 mg/dl (Goldstein & Brown, 1989). Weens hierdie massiewe toename in plasma cholesterol sterf homosigotiese individue gewoonlik aan hartaanvalle

voordat hulle volwassenheid kan bereik, tensy streng cholesterolverminderende behandeling toegepas word (Thompson et al., 1975). Die mutasies wat in beide die LDL reseptor gene by homosigote voorkom kan identies wees (ware homosigote) of van mekaar verskil (saamgestelde heterosigote) (Goldstein & Brown, 1989).

1.3. *Die struktuur van die LDL reseptor geen*

Die mens LDL reseptor geen is geleë op die distale gedeelte van die kort arm van chromosoom 19 (p13.1-p13.3) (Lindgren et al., 1985). Die lengte van die geen is 45 kilobasispare (kb) en dit word verdeel in 18 eksons en 17 introns (Südhof et al., 1985). Die mRNA van die LDL reseptor is 5.3 kb lank en kodeer vir 'n proteïen van 860 aminosure (Yamamoto et al., 1984). Die mRNA bevat 'n lang ongetransleerde streek van 2.5 kb aan die 3'-kant, waarvan die uitstaande kenmerk die teenwoordigheid van verskeie kopieë van die *Alu* familie van herhalende volgordes is (Yamamoto et al., 1984). 'n Nieu verwantskap heers tussen die eksons in die geen en die vyf kenmerkende funksionele gebiede van die LDL reseptor proteïen (Südhof et al., 1985):

Ekson 1 kodeer vir 'n kort 5'-ongetransleerde streek en 21 hidrofobiese aminosure wat die sg. seinvolgorde uitmaak. Hierdie gedeelte word van die reseptorproteïen afgesny gedurende die proses waartydens die proteïen na die endoplasmiese retikulum (ER) beweeg om sodoende 'n volwasse proteïen van 839 aminosure daar te stel.

Gebied 1:

Eksons 2-6 kodeer vir die gebied van die reseptorproteïen wat aan die apo B-100 gedeelte van die LDL molekule bind. Hierdie gebied bevat 'n sisteïenryke volgorde wat sewe keer herhaal word. Introns kom voor aan die einde van herhalings I, II, V, VI en VII, terwyl herhalings III, IV en V ingesluit word binne ekson 4. Die sisteïenherhalings toon 'n sterk homologie met volgordes in verskeie proteïene van die sg. komplimentkaskade (Südhof et al., 1985; Marazziti et al., 1988). Verskillende kombinasies van die veelvoudige sisteïenryke herhalings in die ligandbindende gebied stel die reseptor in staat om twee struktureel verskillende ligande te kan bind, nl. apo B-100 van LDL molekules en apo E van β -VLDL ("very low density lipoproteins") molekules.

Gebied 2:

Die volgende agt eksons in die LDL reseptor (eksons 7 tot 14) kodeer vir 'n gebied wat homoloog is aan die mens epidermale groeifaktor (EGF) voorlopergeen (Südhof et al., 1985). Hierdie gebied bevat drie sisteïenryke herhalings van 40 aminosure elk (bekend as A, B en C) wat verskil van die herhalings in die ligandbindende gebied. Gebied 2 word benodig vir die suurafhanklike dissosiasie van lipoproteïene en reseptors in die endosoom tydens reseptorhersirkulering. Die EGF-voorloper-homologie gebied posisioneer verder ook die ligandbindende gebied op die seloppervlakte sodat dit LDL kan bind (Davis et al., 1987a).

Gebied 3:

Ekson 15 kodeer vir 'n volgorde wat 58 aminosure lank is, verryk is met serien- en treonienresidue en die aanhegtingsetel is vir verskeie O-gekoppelde koolhidraatkettings (Davis et al., 1986a).

Gebied 4:

Ekson 16 en die 5'-gedeelte van ekson 17 kodeer vir die membraanspannende gebied van die reseptor wat uit 22 hidrofobiese aminosure bestaan. Hierdie gebied anker die proteïen aan die selmembraan.

Gebied 5:

Die 5'-gedeelte van ekson 18 en die oorblywende gedeelte van ekson 17 kodeer vir die sitoplasmiese gebied wat die sein bevat wat essensieel is vir die lokalisering van die reseptor in klatrienuitgevoerde putjies op die seloppervlakte (Lehrman et al., 1985a; Davis et al., 1986a; Davis et al., 1987b; Chen et al., 1990). Die oorblywende gedeelte van ekson 18 spesifiseer die 2.5 kb ongetransleerde streek van die mRNA.

Aangesien baie van die eksone in die LDL reseptor geen homologie toon met eksone van ander gene, is die voorstel gemaak dat gene vir verskeie multifunksionele proteïene ontwikkel het deur die rondskuif van eksone. Die feit dat eksone tussen die LDL reseptor geen en ander gene gedeel word, ondersteun Gilbert se hipotese aangaande die aard en funksies van introns (Gilbert, 1978). Volgens Gilbert gee intronvolgordes aanleiding daartoe dat

funksionele gebiede (spesifieke eksone kodeer vir sulke gebiede) tussen verskillende proteïene rondskuif om sodoende mosaïekkombinasies van voorafgaande funksionele eenhede te vorm.

Die regulering van transkripsie van die LDL reseptor geen vind plaas d.m.v. terugvoeronderdrukking wat gemedieer word deur die eindproduk, intrasellulêre cholesterol. DNA-volgordes wat verantwoordelik is vir die sterolreguleerde uitdrukking van die geen in dierselle word in die 5'-aangrensende gedeelte van die LDL reseptor geen aangetref (Goldstein & Brown, 1990; Smith et al., 1990). Drie nie-perfekte direkte herhalings van 16 bp elk, twee AT-ryke opeenvolgings (TATA bokse) en 'n groepering van mRNA-inisiasie-setels word binne 200 bp van die inisieerder-metionienkodon aangetref waar hulle direk betrokke is by transkripsie. Twee van die direkte herhalings, nl. herhalings 1 en 3, toon 'n interaksie met die transkripsie faktor Sp1 en stimuleer op hierdie manier transkripsie. Hierdie volgordes benodig egter die bydrae van die derde direkte herhaling voordat hoë vlak uitdrukking kan plaasvind. Herhaling 2 bevat 'n element bekend as SRE-1 wat positiewe sterolregulering toelaat. In die afwesigheid van sterole werk SRE-1 saam met die twee Sp1-setels om transkripsie te stimuleer, terwyl dit sy aktiwiteit verloor wanneer sterole in die sel akkumuleer. Wanneer selle dus in die teenwoordigheid van sterole aangekweek word, word reseptor mRNA sintese deur bg. regulerende meganisme onderdruk en vind daar 'n gelyktydige afname plaas in LDL reseptors op die seloppervlakte.

1.4. *Mutasies in die LDL reseptor geen*

1.4.1. *Funksionele klasse van mutasies*

Teen 1992 was meer as 150 mutasies in die LDL reseptor geen geïdentifiseer (Hobbs et al., 1992). Hierdie mutasies word in vyf klasse gegroepeer op grond van biosintetiese en funksionele studies (Brown & Goldstein, 1986; Hobbs et al., 1990):

(i) Klas 1 mutasies: nul allele

Individue wat klas 1 mutasies besit, sintetiseer geen reseptore nie of sintetiseer wel reseptore, maar teen 'n lae konsentrasie. Die mees algemene tipes klas 1 mutasies wat eweredig versprei is oor die eksons, is onsin- en leesraamverskuiwingsmutasies. Hierdie mutasies veroorsaak dat mRNA geproduseer word wat van normale grootte is, maar wat 'n lae konsentrasie het (Hobbs et al., 1988). Een van die eerste klas 1 mutasies wat beskryf is, is 'n deleisie van 5 kb wat van ekson 13 tot by 'n *Alu* herhalende element in intron 15 strek (Lehrman et al., 1986). Hierdie mutasie het tot gevolg dat geen reseptorproteïene geproduseer word nie.

(ii) Klas 2 mutasies: transport-defektiewe allele

Klas 2 mutante sintetiseer reseptore wat nie die seloppervlakte bereik nie, aangesien hulle vervoer vanaf die ER na die Golgi-kompleks geblokkeer word. Die reseptore bly gevolglik in die ER waar hulle uiteindelik afgebreek word, of beweeg na die seloppervlakte teen 'n baie stadige tempo. In hierdie

mutante word die O- en N-gekoppelde suikers óf gedeeltelik óf heeltemal geprosesseer. Die blokkering in vervoer wat deur klas 2 mutasies veroorsaak word, is die gevolg van foutmutasies of kort delesies wat nie die leesraam verander nie. Hierdie mutasies verander egter die aminosuurvolgorde van die reseptor en lei dan tot volledige of algehele misvouing van die proteïene. 'n Totaal van 71 (53%) van die 134 FH homosigote wat voorkom in die sg. Dallas versameling wat deur Helen Hobbs en haar medewerkers (Hobbs et al., 1990) saamgestel is, het ten minste een klas 2 alleel.

(iii) Klas 3 mutasies: bindings-defektiewe allele

Klas 3 mutasies lei tot die vorming van reseptorproteïene wat normaal gesintetiseer en vervoer word na die seloppervlakte, maar wat nie LDL molekules normaal kan bind nie. Ongeveer 25% van die fibroblastkulture van die homosigote in die Dallas versameling het proteïene geproduseer wat op klas 3 mutasies dui (Hobbs et al., 1990). Sewe van die nege klas 3 mutasies wat gekarakteriseer is, behels substitusies of herrangskikkings in die sisteïenryke herhalings van die ligandbindende gebied. 'n Verdere twee mutasies behels delesies in die naasliggende EGF voorloper-homologie gebied.

(iv) Klas 4 mutasies: Internalisasie-defektiewe allele

Reseptorproteïene met klas 4 mutasies kan na die seloppervlakte beweeg en LDL-partikels normaal bind, maar is nie in staat om in klatrienuitgevoerde putjies op die seloppervlakte saam te pak nie. Hierdie reseptore kan dus nie

LDL internaliseer nie. Ses verskillende internalisasie-defektiewe allele kon reeds in 1990 gekarakteriseer word (Hobbs et al., 1990). Al die allele het mutasies getoon wat veranderinge in die sitoplasmiese gebied van 50 aminosure veroorsaak (Lehrman et al., 1985a; Lehrman et al., 1985b; Davis et al., 1986b; Lehrman et al., 1987a; Aalko-Setälä et al., 1989). Die mutasies is verder geklassifiseer in twee subgroepe afhangende of die mutasie die sitoplasmiese gebied alleen behels en of dit die aangrensende membraanspannende streek insluit.

(v) Klas 5 mutasies: Hersirkulerings-defektiewe allele

Geendefekte word geklassifiseer as klas 5 mutasies as dit tot gevolg het dat reseptore ligande normaal bind en internaliseer, maar misluk om die ligande in die endosoom vry te stel. Op hierdie manier kan hersirkulering van die reseptore na die seloppervlakte nie plaasvind nie. 'n Totaal van 22% van die fibroblaststamme in die Dallas versameling het 'n klas 5 fenotipe getoon (Hobbs et al., 1990). Dit sluit in 11 foutmutasies wat almal in die homologe EGF-voorloper-gebied voorkom. Aangesien hierdie gebied die suurafhanklike dissosiasie van die reseptor (Davis et al., 1987a) en die ligand in die endosoom medieer ('n essensiële proses vir reseptorhersirkulering), het mutasies in hierdie gebied tot gevolg dat die reseptor-ligand-kompleks gedegradeer word en die reseptor nie na die seloppervlakte kan terugkeer nie.

1.4.2. Mutasies in die promotorstreek

Tot en met 1992 is slegs drie mutasies wat natuurlik voorkom in die promotorstreek geïdentifiseer. Hierdie mutasies sluit in twee foutmutasies ("missense mutations") en een 3 bp-delesie. Al die mutasies is betrokke by een van die twee Sp1 bindingsetels (Hobbs et al., 1992).

Die lae voorkoms van promotormutasies kan waarskynlik toegeskryf word aan die beperkte lengte van hierdie segment (200 bp) in kontras met die baie langer proteïenkoderende volgorde (Hobbs et al., 1992). Top et al. het in 1992 tot die gevolgtrekking gekom dat mutasies in die regulatoriese elemente van die promotorvolgorde nie 'n groot rol speel in die etiologie van FH nie, aangesien nie een pasiënt van 'n groep van 350 FH pasiënte mutasies in die promotorstreek getoon het met 'n kombinasie van PKR en DGGE tegnieke nie.

1.4.3. Delesies en Inersies

Studies wat m.b.v. die Southern-kladtegniek uitgevoer is in 'n groot aantal FH pasiënte het getoon dat groot strukturele herrangskikkings 2 - 6% van LDL reseptor geendefekte uitmaak (Horsthemke et al., 1987; Langlois et al., 1988; Kajinami et al., 1990). Dit is 'n aanduiding dat die meerderheid van FH-verwante mutasies nukleotiedsubstitusies of klein delesies en inersies is wat buite die opsporingvlak van die Southern-klad metode val.

Karakterisering van verskeie groot delesies in die LDL reseptor geen het aangetoon dat daar setels in eksons 1 tot 8 en eksons 13-18 van die LDL reseptor geen is waar groot herrangskikkings by voorkeur plaasvind (Langlois et al., 1988). Die meeste van die delesies wat reeds op molekulêre vlak gekarakteriseer is, is die resultaat van rekombinasie tussen herhalende volgordes wat by die delesie-breekpunte gevind word. Hierdie herhalende volgordes is deel van die *Alu* familie van herhalende volgordes. Die *Alu* herhalings is hoofsaaklik teenwoordig in introns 2 tot 8, en in introns 12 tot 17.

Inersies in die LDL reseptor geen het ook ontstaan a.g.v. nie-homoloë rekombinasie tussen *Alu* herhalings. In die Dallas versameling van mutante allele (Hobbs et al., 1990) is groot strukturele herrangskikkings by 13% (24 van die 183 mutante allele) van die mutante allele opgespoor. Hierdie groep het egter net drie inersies ingesluit, waarvan die verlengde proteïen in twee gevalle die gevolg is van die duplisering van sekere eksons. Kotze et al. (in druk, 2) het 'n 18 bp duplikasie in ekson 4 van die LDL reseptor geen opgespoor in die Afrikaners. Dit blyk dat groot inersies in die LDL reseptor geen skaarser is as delesies.

1.5. *Molekulêre metodes vir die opsporing van mutasies*

Die verskeidenheid van mutasies wat in die menslike genoom voorkom kan varieer van enkelbasispaarveranderinge tot herrangskikkings wat groot dele van chromosome kan behels, of selfs volledige chromosome kan insluit. Die bestaan van verskillende mutasie-tipes noodsaak diverse benaderings tot

mutasie-opsporing. Dit is dus duidelik dat tegnieke soos die Southern-klad metode (Southern, 1975) wat gebruik word om groot veranderinge op te spoor, onsuksesvol sal wees in die opsporing van puntmutasies, klein delesies en insersies. Verskeie tegnieke is oor die afgelope paar jaar ontwikkel om enkelbasis-substitusies in PKR-produkte op te spoor. Die mees algemene tegnieke sluit in RNase A vertering, hidroksielamien/osmium tetroksied chemiese snyding, denaturerende gradiënt gel-elektroforese (DGGE), enkelstring-konformasie-polimorfisme (ESKP) analise en heterodupleks-analise. Die RNase A vertering (Myers et al., 1985) en die chemiese snyding (Cotton et al., 1988) metodes is nie prakties maklik uitvoerbaar vir die sifting van 'n groot aantal individue nie, aangesien hierdie metodes verskeie laboratoriummanupilasies vereis vir elke monster. Verder word die herhaalbaarheid van hierdie twee tegnieke vir die opspoor van bekende mutasies bevraagteken (Theophilus et al., 1989). Die DGGE metode (Sheffield et al., 1989) is 'n sensitiewe en betroubare metode, maar dit vereis die addisionele sintese van GC-ryke 5'-punte vir alle voorvoeders en spesiale elektroforese-apparaat. Van die meer suksesvolle metodes om mutasies vinnig en maklik op te spoor, is:

1.5.1. Polimerase ketting reaksie

Die bestudering van spesifieke nukleotiedvolgordes word dikwels beperk deur die beskikbaarheid van slegs klein hoeveelhede materiaal waarmee gewerk kan word. Die polimerase ketting reaksie (PKR) (Saiki et al., 1985; Mullis &

Faloona, 1987) het egter beperkings soos hierdie oorbrug en is in staat tot die selektiewe verryking vir 'n spesifieke DNA-volgorde met 'n faktor van 10^6 . Hierdie revolusionêre tegniek het die manier waarop genetiese diagnose uitgevoer kan word geweldig verbeter. Dit het verder daartoe bygedra dat die proses van mutasie-opsporing versnel is en die tegniek word ook ekstensief gebruik om onder meer die volgorde van 'n DNA-segment direk te bepaal.

PKR behels twee oligonukleotied-voorvoorders wat aan weerskante van 'n spesifieke DNA-volgorde bind sodat die streek daartussen selektief vermeerder word na herhaalde siklusse van hitte-denaürering, binding van voorvoorders aan komplementêre volgordes en verlenging van die gebonde voorvoorders met 'n DNA-polimerase. Elke opeenvolgende siklus verdubbel die hoeveelheid van DNA-produk, omdat die produkte van een rondte van amplifikasie as template dien vir daaropvolgende amplifikasie. Op hierdie manier word die spesifieke teikensegment eksponensieel vermeerder.

Die PKR benodig die volgende: deoksinukleotiede om beide die energie en die nukleosiede vir DNA-sintese te voorsien, DNA-polimerase ensiem, voorvoorders, templaar en 'n buffer wat magnesium bevat. Die oorspronklike protokols vir die PKR (Saiki et al., 1985; Mullis & Faloona, 1986; Mullis & Faloona, 1987) het van die Klenowfragment van *E. coli* DNA-polimerase I gebruik gemaak om die verlenging van die gebonde voorvoorders te kataliseer. Aangesien bg. ensiem geïnaktiveer word by die temperature wat benodig word om DNA te denatureer, moes vars ensiem by elke rondte van amplifikasie bygevoeg word. Dit het swak opbrengs en produkte van

varieerbare grootte tot gevolg gehad (Scharf et al., 1986). Hierdie probleme is uit die weg geruim met die bekendstelling van 'n termostabiele DNA-polimerase (Saiki et al., 1988) wat uit die termofiliese bakterium *Thermus aquaticus* geïsoleer is en wat ekstensiewe inkubasie by 95°C kan weerstaan.

1.5.2. Die heterodupleksmetode

Hierdie metode word oor die algemeen gebruik in gevalle waar die posisie van die mutasie onbekend is en dien dus as 'n siftingsmetode vir nuwe mutasies (Keen et al., 1991; White et al., 1992). Voordele van die heterodupleks-siftingsmetode is o.a. die eenvoud en die feit dat die gebruik van radio-isotope vermy kan word. Die grootste nadeel is dat 100% opsporing van mutasies nie moontlik is met die toepassing van hierdie tegniek nie. Daar word beraam dat die heterodupleksmetode tussen 80-90% van mutasies opspoor.

Die beginsel waarop hierdie metode berus is die volgende. 'n Heterodupleks wat bestaan uit twee komplementêre stringe met 'n enkele misparing se mobiliteit in 'n nie-denaturende poli-akrielamiedgel sal verskil van die mobiliteit van die ooreenstemmende homoduplekse (Keen et al., 1991; Perry & Carrell, 1992; White et al., 1992). Op hierdie manier kan die twee tipes duplekse geskei word, aangesien die heterodupleks-DNA gewoonlik stadiger in die gel migreer as die homodupleks-DNA.

Dit is moontlik dat toekomstige modifikasies in heterodupleksanalise die opsporing van mutasies nader na 100% kan bring, maar dit blyk dat hierdie tegniek die beste benut kan word wanneer dit in kombinasie met die enkelstring-konformasie-polimorfisme tegniek gebruik word.

1.5.3. Die enkelstring-konformasie-polimorfisme (ESKP) opsporingstegniek

Die ESKP tegniek (Orita et al., 1989a; 1989b) is as 'n siftingsmetode ontwikkel om PKR-geamplifiseerde DNA-fragmente te ondersoek vir onbekende mutasies, maar dit kan ook gebruik word om bekende mutasies op te spoor of uit te skakel.

Die voordele van ESKP is dat dit eenvoudig is, geen toksiese chemikalieë of tydrowende hibridisasie-stappe benodig nie en dat dit tans ook as 'n nie-radio-aktiewe tegniek benut kan word. Die grootste nadeel van hierdie siftingsmetode is dat die sensitiwiteit daarvan uiters afhanklik is van die eksperimentele kondisies, soos die tipe gelmatriks, temperatuur, elektroforetiese toestande, dimensies van die gel, oorlaaiing van die gel en die isotoop wat gebruik word indien radio-aktiewe ESKP gedoen word. Dit blyk ook dat hierdie metode nie alle enkelbasisveranderinge kan opspoor nie en gevolglik moet variërende eksperimentele kondisies toegepas word om optimale toestande vir spesifieke mutasies of fragmentlengtes daar te stel.

Die beginsel waarop die tegniek berus is die volgende. Die elektroforetiese mobiliteit van enkelstringnukleïensure is onder nie-denaturende toestande nie net afhanklik van die grootte van die DNA-enkelstringe nie, maar ook van die DNA-volgorde. Met ESKP-analise word 'n mutante volgorde waargeneem as 'n verandering in mobiliteit op nie-denaturerende poli-akrielamiedgels. Die verskil in mobiliteit is die gevolg van die verskillende konformasies wat enkelstring DNA-monsters, wat in basisvolgorde verskil, onder nie-denaturende toestande aanneem.

Kort fragmente is die geskikste vir die opspoor van mutasies deur ESKP, en dus word fragmente van minder as 400 bp gewoonlik geamplifiseer vir analyse met hierdie metode.

Ethidiumbromied of silwerkleuring is sensitief genoeg om mobiliteitsverskille in die gels aan te toon (Picci et al., 1992; Yap & McGee, 1992), maar radio-isotope word die algemeenste gebruik.

1.5.4. Die Southern-kladtegniek

Die metode van Southern (Southern, 1975) word algemeen gebruik om groot herrangskikkings soos delesies en insersies op te spoor. In uitsonderlike gevalle kan puntmutasies opgespoor word wanneer die mutasie binne 'n restriksie-endonuklease herkenningsetel geleë is.

Met uitvoering van die tegniek word DNA wat deur restriksie-endonukleases verteer is deur gel-elektroforese gefraksioneer, waarna die DNA-fragmente as

enkelstringe na 'n geskikte membraan oorgedra word d.m.v. kapillêre oordrag. 'n DNA-peilfragment wat komplementêr is aan die DNA-volgorde waarvoor gepeil word, word radio-aktief gemerk, gedensatureer en gehibridiseer met die volgordes op die membraan. Die spesifieke plek op die membraan waar die peiler bind word gevisualiseer deur outoradiografie. Tegnieke wat nie-radio-aktiewe peilers gebruik is redelik onlangs ontwikkel.

1.5.5. DNA volgorde bepaling

Die uiteindelijke karakterisering van 'n mutasie vereis die bepaling van die DNA-nukleotiedvolgorde. Volgorde bepaling van PKR-produkte kan as 'n siftingsmetode gebruik word, maar dit is tydrowend en duur. Die oorspronklike templaar vir die PKR kan mRNA (en dus cDNA) of genomiese DNA wees. Die PKR-produk kan dan gesubkioneer word in 'n geskikte vektor of die volgorde daarvan kan direk bepaal word.

Daar is twee metodes vir die volgorde bepaling van DNA, nl. die chemiese metode van Maxam en Gilbert (Maxam & Gilbert, 1980) en die ensiematiese metode van Sanger et al. (1977).

1.5.6. Die amplifikasie-inhiberende-mutasie-sisteem (AIMS)

Deur een van die voorvoeders van 'n PKR-amplifikasie-paar by die punt van 'n bekende mutasie te plaas waar hierdie voorvoerder óf in die mutante óf in die wilde-tipe vorm is, kan PKR-toestande aangepas word sodat slegs die mutant of die wilde-tipe onderskeidelik geamplifiseer word. Die AIMS-tegniek

(Newton et al., 1989) is een van die variante van bg. benadering en is afhanklik van die misparing van die spesifieke voorvoerder by sy 3'-kant. Die misparing het dan tot gevolg dat amplifikasie óf plaasvind óf dat dit verhoed word. Ander ontwikkelinge (Chamberlain et al., 1988; Chamberlain et al., 1990) het gelei tot verdere variante soos multipleks-PKR waar veelvoudige spesifieke allele gelyk geamplifiseer kan word. Indien die geamplifiseerde fragmente in grootte varieer is dit moontlik om elkeen waar te neem na skeiding d.m.v. gel-elektroforese.

Hierdie tegniek is dus 'n eenvoudige en effektiewe uitbreiding van die PKR-metode wat diagnosties gebruik kan word vir die vinnige opsporing van bekende mutasies. Hierdie nie-radio-aktiewe metode kan duidelik onderskei tussen heterosigote en homosigote by 'n lokus vir enige van die allele.

1.6. *Polimorfismes in die LD¹ -septor geen*

1.6.1. Restriksie-fragment-lengte-polimorfismes (RFLP's)

Die term polimorfisme is deur Vogel en Motulsky in 1986 gedefinieer as 'n Mendeliese kenmerk wat in 'n populasie voorkom wanneer ten minste twee fenotipes waarneembaar is, waarvan nie een voorkom teen 'n frekwensie van minder as 1% nie. Dit beteken dus dat die voorkoms van so 'n genetiese toestand die gevolg is van selektiewe bevoordeling in die heterosigoot, aangesien die frekwensie van die toestand nie verklaar kan word deur mutasie alleen nie.

In die verlede kon siegs polimorfismes wat gelei het tot onderskeibare verskille tussen geenprodukte opgespoor word. Met die toetrede van rekombinante-DNA-tegnologie is dit nou moontlik om DNA-polimorfismes direk te bestudeer in die koderende en die nie-koderende streke van die genoom. Restriksie-endonukleases kan polimorfismes opspoor wat ontstaan deurdat enkelbasispaarveranderinge 'n restriksie setel skep of vernietig. Polimorfismes wat ontstaan deur insersies, delesies en herrangskikkings wat die lengte van die DNA tussen twee restriksie setels beïnvloed, kan ook deur restriksie-endonukleases opgespoor word. Die meerderheid van polimorfismes ontstaan klaarblyklik a.g.v. enkelbasispaarveranderinge.

Restriksie-fragment-lengte-polimorfismes (RFLP's) (Cooper & Schmidtke, 1984) kom as normale variasie tussen individue voor en kan as genetiese merkers gebruik word wanneer hulle nabygekoppel is aan 'n siektelokus. RFLP's word dan gebruik om die assosiasie van die siekte met 'n populasie te bestudeer of om die segregasie van die siekte en merkerallele in 'n familie te volg.

Die moontlike meganismes waardeur RFLP's ontstaan en behou word in die menslike populasie is deur Hill en Wainscoat (1986) opgesom. Die eenvoudigste van hierdie meganismes veronderstel dat daar geen seleksie van die allele by 'n polimorfiese lokus is nie en behels die toename in die frekwensie van 'n allele d.m.v. genetiese drywing ("genetic drift"). Aangesien die meerderheid van DNA-polimorfismes in die nie-koderende streke voorkom (Cooper et al., 1985), is daar goeie gronde vir die veronderstelling dat RFLP's

van hierdie tipe is. Die belangrikste alternatief tot voorafgenoemde meganisme is dat DNA-polimorfismes behou word deur selektiewe druk, heel moontlik deur heterosigootbevoordeling. Die derde meganisme wat sorg dat RFLP's in die populasie behou word, is deur die vorming van herhalingsmutasies. Dit is reeds vir 'n geruime tyd bekend dat RFLP's teen 'n hoë frekwensie opgespoor word deur restriksie-endonukleases wat die dinukleotied CpG in hulle herkenningsetels bevat (Barker et al., 1984; Cooper et al., 1985). Die potensiele bestaan van herhalingsmutasies by spesifieke CpG-setels hou belangrike implikasies in t.o.v. die keuse van die restriksie-endonukleases wat gebruik word in siekte assosiasie studies.

Die verwantskap tussen RFLP's en vatbaarheid vir spesifieke siektes kan die beste verklaar word in terme van koppelingsdisekwilibrium. 'n Koppelingsdisekwilibrium is teenwoordig wanneer spesifieke allele by een lokus saam met spesifieke allele by 'n ander lokus voorkom op dieselfde chromosoom teen frekwensies hoër as wat toegeskryf kan word aan kans alleen. Wanneer 'n mutante geen se frekwensie in die populasie toeneem, sal individue in daaropvolgende generasies nie net die mutante geen oorerf nie, maar ook die spesifieke allele van naasliggende RFLP's. Die assosiasie tussen die merkerallele en die mutante geen sal met tyd afneem weens rekombinasie. In 'n ewekansige populasie waarin daar geen seleksie plaasvind nie, sal die verwagte koppelingsdisekwilibrium nul wees. Aangesien sulke toestande skaars is in die praktyk, kan 'n mate van

koppelingsdisekwilibrium verwag word as 'n normale verskynsel oor relatief kort afstande (Lewontin, 1974; Golding, 1984).

Tradisioneel is RFLP's opgespoor deur van die Southern-klad metode gebruik te maak. Die PCR het dit egter moontlik gemaak om 'n kort DNA-streek wat rondom die restriksie-endonuklease setel van belang geleë is, te amplifiseer. Die geamplifiseerde fragment word dan aan vertering deur die geskikte restriksie-endonuklease onderwerp, waarna die DNA direk op 'n gelmatriks gevisualiseer kan word.

1.6.2. Dinukleotied-herhalings polimorfismes

Mikrosatellietherhalings (ook bekend as eenvoudige nukleotiedvolgorde herhalings), spesifiek die dinukleotiedherhalings $(AC)_n$, $(AG)_n$ en $(AT)_n$, is volop in die eukariotiese genoom en hoogs polimorfies a.g.v. die variasie in die aantal herhalende eenhede (Weber & May, 1989; Tautz, 1989; Litt & Luty, 1989). Mikrosatelliete bestaan gewoonlik uit 10-50 kopieë van motiewe wat 1-6 bp lank kan wees en wat as perfekte tandem herhalings, nie-perfekte (onderbreekte) herhalings of saam met 'n ander herhalingstipe kan voorkom. Hierdie eenvoudige herhalings word geanaliseer deurdat PCR-amplifikasie van 'n kort genomiese streek, wat die herhalende volgorde bevat, uitgevoer word. Daarna word die lengtes van die herhalings na gel-elektroforese bepaal. Agarose gels kan gebruik word om die bande te skei, maar vir optimale resolusie is dit dikwels nodig om denaturerende poli-akrielamiedgels te gebruik. Hierdie tipe polimorfisme is stabiel genoeg om in genetiese

analise te gebruik. Hoogs polimorfiese, ewekansig verspreide mikrosatelliete kan 'n groot bydrae lewer tot die identifikasie van vatbaarheidsgene vir algemene mensgenetiese siektes.

1.6.3. Die bepaling van haplotipes

RFLP-analise kan verbeter word deur die samestelling van haplotipes. 'n RFLP-haplotipe is die spesifieke kombinasie van allele van restriksie-endonuklease setels en dus die spesifieke patroon van polimorfismes saamgekoppel op 'n chromosoom. Haplotipe-analise is nie net bruikbaar in koppelingstudies in families nie, maar word ook toegepas in populasie-studies. Haplotipes kan ook baie nuttig wees om die oorsprong en migrasie van spesifieke allele te bepaal (Wainscoat et al., 1983; Chakravarti et al., 1984; Orkin et al., 1984).

In 'n poging om spesifieke mutasies in die β -globien geen te identifiseer, het Orkin et al. (1982) DNA-monsters van pasiënte wat klinies homosigoties is vir β -thalassemie bestudeer. Na bestudering van die polimorfiese restriksie-endonuklease setels in die β -globiengene groep (" β -gene cluster") van drie pasiënte en hulle ouers, is gevind dat al drie die pasiënte dieselfde mutasie, wat 'n translasiestopsein tot gevolg het, toon. Verder is daar gevind dat al drie die pasiënte 'n assosiasie toon tussen die onsinmutasie-gene en haplotipe II-chromosome. Die assosiasie van 'n spesifieke thalassemie-mutasie met een haplotipe, het voorgestel dat elke haplotipe die teenwoordigheid van 'n spesifieke mutante alleel kan aandui. Die koppeling

van spesifieke mutasies en haplotipes is 'n voorbeeld van koppelingsdisekwilibrium waar spesifieke allele assosieer is met neutrale DNA-veranderinge. Die koppelings kan verlore gaan weens die veelvoudiglike ontstaan van spesifieke defekte of deur DNA rekombinasie (of mutasie) wat dan die geassosieerde restriksie setel polimorfismes kan verander.

In hierdie studie is mutasie- en haplotype-analise uitgevoer om te probeer vasstel of die chromosomale agtergrond onderliggend aan spesifieke LDL reseptor geen mutasies in die Kleurlingpopulasie dieselfde is as in ander populasies waar dieselfde mutasies beskryf is. Op hierdie manier kon vasgestel word of die mutasies oorgeërf is vanaf 'n gemeenskaplike voorouer en of onafhanklike gebeurtenisse tot die ontstaan van die mutasies gelei het.

1.7. Die diagnose van FH

Roetine kliniese en biochemiese kriteria nl., familie- en pasiëntgeskiedenis, die teenwoordigheid van tendon xantomas en serum LDL konsentrasie, kan in die meeste gevalle 'n diagnose van heterosigotiese FH voorsien. Baie eksogene faktore soos dieet en die gebruik van hipolipidemiese middels, asook die voorkoms van serum apolipoproteïene as genetiese polimorfismes, kan egter die fenotipiese uitdrukking van FH modifiseer en dus die diagnose kompliseer. Dit is moeilik om jong FH pasiënte te diagnoseer, aangesien kliniese tekens nie noodwendig teen 'n vroeë ouderdom ontwikkel nie. Meer nog, familiële defektiewe apolipoproteïen (apo) B-100 (FDB) produseer 'n

kliniese beeld soortgelyk aan FH (Innerarity et al., 1990). Aangesien serum cholesterolwaardes nie altyd 'n definitiewe diagnose van FH kan verseker nie, kan daar as alternatief 'n velbiopsie geneem word en die fibroblaste in kultuur gekweek word vir 'n direkte meting van die binding van die gemerkte LDL aan die sel se LDL reseptore. Hierdie tegniek is tegnies moeilik en oorvleuelende waardes kan verkry word tussen normale en heterosigotiese FH individue. Om verskeie redes is dit dus duidelik dat die kliniese diagnose van FH tekort skiet.

Min of meer 150 verskillende mutasies is reeds in die LDL reseptor geen gerapporteer (Hobbs et al., 1990). Die identifikasie van 'n mutasie in die LDL reseptor geen van 'n individuele FH pasiënt is van waarde om verskeie redes. Nie net kan 'n beter diagnose uitgevoer word nie, maar geaffekteerde individue kan teen 'n vroeë ouderdom geïdentifiseer word deur gebruik te maak van DNA-analise in gevalle waar diagnose op kliniese gronde alleen nie moontlik is nie. Op hierdie manier kan voorkomende advies en behandeling gegee word waar nodig. Mediese behandeling kan geoptimeer word, aangesien fenotipiese uitdrukking van FH verwant is aan die aard van die mutasie in die LDL reseptor geen. Kontula et al. (1992) het die kliniese en molekulêre diagnose van FH ondersoek in 10 families waarvan die draerstatus van 'n mutante LDL reseptor geen bekend was. Deur gebruikmaking van DNA-analise is vasgestel dat 85% van die familie-lede korrek op kliniese gronde as FH pasiënte of individue sonder FH geklassifiseer is. Die oorblywende 15% individue is óf misgediagnoseer óf

kon nie gekategoriseer word op kliniese vlak nie. DNA-analise het egter akkurate diagnose moontlik gemaak.

Henderson et al. het in 1988 'n 2.5 kb delesie, wat eksons 7-8 insluit, in die Kleurlinge wat deel uitgemaak het van sy studie-populasie, waargeneem. In die twee families waarin hierdie delesie geïdentifiseer is, het die delesie gedien as 'n genetiese merker vir FH.

1.8. Die Kleurlinge van Suid-Afrika en FH

Botha en Beighton (1983) het in 1983 beraam dat daar in Suid-Afrika twee-en-'n-half miljoen blanke Afrikaanssprekende persone en twee miljoen of meer sogenaamde Kleurlinge en Engelssprekendes is wat gemeenskaplike voorouers het. 'n Hoë persentasie van hierdie individue het van minder as 2000 setlaars afgestam. Hierdie setlaars was hoofsaaklik Duitsers, Franse en Nederlanders wat in die 17de en 18de eeue aan die Kaap gearriveer het; die totale setlaarpopulasie was slegs 15 000 individue in 1800 (Theal, 1922). Hierdie klein genepoel het verskeie kere uitgebrei sonder veel verdunning van buite af.

In Suid-Afrika word die term "Kleurling" net gebruik om mense te beskryf met 'n gemengde ras oorsprong. 'n Kleurling in S.A. is meer spesifiek iemand met 'n Kaukasiese voorouerelement. Die ander element kan Khoi, Negroïediese slaaf, vry Negroïed of San wees. Die biologiese geskiedenis van die Kleurlinge in S.A. is diffuus. Tog kan hulle oorsprong teruggevoer word na 'n

datum kort nadat die Nederlands Oos-Indiese Kompanjie 'n halfwegstasie in 1652 aan die Kaap gestig het (Nurse et al., 1985).

Die redes vir die keuse van die Kleurlinge as studie-populasie spruit uit onder andere die sg. CRISIC I studie:

Benatar het in 1986 in 'n verslag oor die gesondheidsorg in Suid-Afrika gerapporteer dat die siekte- en mortaliteitsprofiel van die Kleurlingpopulasie vergelykbaar is met die profiel in ontwikkelende lande. Koronêre hartsiekte (KHS) wat algemeen onder Suid-Afrikaanse blankes is, is toenemend besig om te manifesteer in die Kleurlingpopulasie. Hierdie bevinding het gelei tot die CRISIC I studie, wat KHS risikofaktore in die Kleurlinge van die Kaapse skiereiland ondersoek het.

Uit die CRISIC I studie (Steyn et al., 1985, 1986, 1987a, 1987b, 1989, 1990a) was dit duidelik dat die Kleurlingpopulasie van die Kaapse skiereiland 'n hoë risiko het om KHS te ontwikkel. Die hoof risikofaktore, nl. rook, hipertensie en hipercholesterolemie was baie algemeen in hierdie populasie. Veral wat die rookgewoonte betref, is gevind dat beide Kleurlingmans en vroue meer rook as blanke mans en vroue in S.A. (Steyn et al., 1985; 1987a). Hipertensie onder die Kleurlinge (Steyn et al., 1986) was ná die Zoeloes die hoogste van die hoof populasie-groepe in Suid-Afrika (Seedat & Seedat, 1982).

Die CRISIC I studie (Steyn et al., 1987b) het verder aangetoon dat meer as 70% van die Kleurlinge serum cholesterolvlakke het wat 'n KHS risiko inhou. Min Kleurlinge het 'n gesonde dieet gevolg en hulle kennis van gesonde diëte

was swak. Van die drie hoof risiko-faktore vir KHS was hipercholesterolemie, gedefinieer deur ouderdom- en geslagspesifieke afsnypunte, in 'n groter proporsie van die studie populasie van die CRISIC I studie teenwoordig as rook of hipertensie. Dus kan dit die grootste bydraende faktor wees vir hulle KHS mortaliteit.

Die afleidings van die CRISIC I studie in bg. verband (Steyn et al. 1987b) was dat die assosiasie tussen KHS en hipercholesterolemie 'n dringende behoefte daar stel om die serum cholesterolvlakke in die Kleurlingpopulasie te verlaag. 'n Effektiewe tussentredende program (Steyn et al., 1990b) is dus nodig om die serum cholesterolvlak te verminder in die hele populasie. Dit kan gedoen word deur dieetmodifikasie en deur individue te sif vir die risiko vir familiële hipercholesterolemie (FH).

1.9. Doel van studie

Om 'n bydrae te lewer tot die poging om die geendefekte onderliggend aan die segregasie van FH in die Kleurlingpopulasie van Suid-Afrika te identifiseer.

Dit is bereik deur die volgende stappe:

1. Die sifting van die Kleurlingpopulasie vir die drie bekende FH-Afrikaner mutasies (Asp₂₀₆→Glu, Asn₁₅₄→Asp, Val₄₀₈→Met), wat verantwoordelik is vir FH in tot 90% van FH gevalle, deur gebruik te maak van die AIMS-PKR metode.

2. Die sifting van ekson 4 van die LDL reseptor geen vir nuwe en bekende mutasies deur gebruik te maak van heterodupleks-analise en van die enkelstring-konformasie-polimorfisme siftingstegniek (nie-radio-aktief).
3. Die bepaling van mutasie-geassosieerde haplotipes om die oorsprong van bekende mutasies vas te stel.
4. Die ondersoek van 'n aantal FH pasiënte vir die bekende 2.5 kb delesie van eksons 7-8 wat reeds in die Kleurlinge geïdentifiseer is, deur gebruik te maak van Southern-klad metodes.
5. Die ondersoek van die alleelfrekwensies van vier polimorfiese merkers in 'n kontrole en FH populasie om vas te stel of die populasies in Hardy-Weinberg ewililibrium is en of spesifieke allele statisties beduidende verskille toon.
6. Die analise van 'n TA-herhalende-dinukleotied-volgorde in ekson 18 van die LDL reseptor geen om die informatiwiteit van hierdie merker vas te stel vir toekomstige assosiasiestudies in FH families.

2. MATERIAAL EN METODES

2.1. MATERIAAL

2.1.1. Pasiënte

Gedurende die periode 1990 tot 1994, is bloedmonsters van 'n totaal van 70 nie-verwante hipercholesterolemiese Kleurlinge vanaf die lipiedkliniek van Tygerberg Hospitaal (TBH), Tygerberg, verkry. Hierdie Kleurlinge is verwys vir 'n molekulêre diagnose van FH. DNA-monsters van 'n verdere 117 nie-verwante hiperlipidemiese Kleurlinge, is in 1994 vanaf die lipiedkliniek van Groote Schuur Hospitaal (GSH), Kaapstad verkry. FH kon in sommige pasiënte gediagnoseer word deur die verwysende dokter, maar die meeste pasiënte is slegs op grond van 'n verhoogde totale cholesterolvlak (TC) verwys. Dit was in ooreenstemming met aanbevelings, gebaseer op 'n loodsstudie, wat deur Kotze et al. (1992) uitgevoer is. 'n Totaal van 31 pasiënte afkomstig van TBH se lipiedkliniek kon as FH heterosigote gediagnoseer word op grond van die volgende kriteria (Kotze et al., 1987a): Totale serum cholesterolvlakke van alle pasiënte moes ten minste gelyk wees aan die 80ste persentiel vir hulle ouderdom- en geslagskategorieë (Rossouw et al., 1985). 'n Normale serum trigliseriedvlak van gelyk aan of laer as 2.0 mmol/L moes teenwoordig wees. Verder moes die moontlike FH heterosigoot óf kliniese kenmerke van FH besit (tendon xantomas van die Achilles tendon of die tendons op die dorsum van die hand, met of sonder xantelasma) óf 'n

familiegeskiedenis van vroeë koronêre hartsiekte (KHS). Dit is gedefinieer dat 'n vroeë KHS familiegeskiedenis teenwoordig is wanneer die moontlike FH heterosigoot gerapporteer het dat ten minste twee eerste- of tweede-orde familieleden KHS gehad het voor die ouderdom van 50 jaar. In totaal was daar dus 156 hiperlipidemiese Kleurlinge, van beide lipiedklinieke, betrokke by die studie.

Bloedmonsters is ook versamel van 10 Kleurling laboratoriumpersoneellede wat gewillig was om aan die projek deel te neem. 'n Totaal van 18 nie-verwante Kleurlinge wat deel uitgemaak het van 'n Sistiese Fibrose (SF) studie, en wat as SF heterosigote geklassifiseer is, is verder beskikbaar gestel.

2.1.2. Media en buffers

Media en buffers is volgens die voorskrifte in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook et al., 1989) voorberei.

2.2. METODES

2.2.1. Lipiedbepalings

Lipiedbepalings is deur die personeel by die NNPVI (Nasionale Navorsingsprogram vir Voedingsintervensie) uitgevoer. Die totale cholesterol (TC) en hoë-digtheid lipoproteïen (HDL) cholesterolvlakke is bepaal op 'n Gilford outomatiese analiseerder deur van die Boehringer CHOD-PAP

ensiematiese metode gebruik te maak. Die meting van HDL cholesterol is gedoen deur lipoproteïene wat apoproteïen B bevat met 'n dekstraansulfaat/magnesiumchloried-oplossing te presipiteer. Die trigliseriedvlakke is bepaal m.b.v. die Boehringer ensiematiese Peridochrom metode. In elke geval is die Gilford outomatiese analiseerder teen Precilip of Precilip EL kontrole-sera, wat deur Boehringer Mannheim gekorrigeer is vir die spesifieke pakket in gebruik, gekalibreer. Twee kontrole-monsters is in elke groep monsters wat geanaliseer moes word, ingesluit. Plasma lae-digtheid lipoproteïen cholesterol (LDL-C) is bereken deur van die Friedewald vergelyking gebruik te maak ($\text{LDL-cholesterol mmol/L} = \text{totale cholesterol} - [\text{HDL} + \text{TG}/2.18]$) (Cuthbert et al., 1986).

2.2.2. Voorbereiding van genomiese DNA

DNA is vanaf limfosiete geïsoleer volgens 'n modifikasie van die metode van Kunkel et al. (1977).

Perifere bloed is in vakuumbuise versamel wat EDTA as anti-koagulant bevat het. Daarna is die bloed in 50 ml plastiekbuisse met skroefdoppe gegooi, afgeswaai vir 10 min. by 4000 rpm (Sigma 3-1 sentrifuge) en die serum afgetrek en apart gestoor by -20°C vir lipiedbepalings. Die bloedselsuspensie in die skroefdopbuisse is ook by -20°C gestoor totdat DNA-ekstraksies as volg uitgevoer kon word:

1. Gevriesde bloedselsuspensies is stadig by kamertemperatuur ontdooi en op ys geplaas totdat daar met die volgende stap voortgegaan kon word.
2. Koue sellise buffer (0.32 M Sukrose, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-Cl pH 7.6) is bygevoeg totdat 'n finale volume van 45 ml bereik is, waarna daar vir 20 min. by 4000 rpm gesentrifugeer is (Sigma 3-1 sentrifuge).
3. Die supernatant (bo-vloeistof) is versigtig afgegooi sodat die sediment nie versteur word nie en die gesentrifugeerde kerne is deeglik gesuspendeer in 4.5 ml koue 1 x SET ("Sodium chloride, EDTA, Tris") buffer (0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.01 M Tris-Cl pH 7.5), 250 μl 20% Natriumdodesielsulfaat (SDS) en 100 μl Proteïenase K (10 mg/ml).
4. Die hergesuspendeerde kerne is daarna vir 2-4 uur in 'n 37°C waterbad geïnkubeer.
5. Na die inkubasie-stap is SET buffer bygevoeg tot 'n finale volume van 7.5 ml, asook 1.5 ml versadigde sout (6 M NaCl) en 10 ml chloroform/isoamielalkohol (24:1).
6. 'n Stadige rolproses van 60 min. lank in 'n Hub-O-Wai-rolmasjien is gevolg deur sentrifugering vir 10 min. (4000 rpm).
7. Die boonste waterige fase is verwyder en in 'n skoon skroefdobuis geplaas.

8. Die DNA is gepresipiteer deur twee volumes yskoue 100% etanol (ETOH) by te voeg en goed te meng. Die DNA kon op hierdie stadium rondom 'n pasteurpipet gespoel word en versigtig uit die etanol gehaak word.
9. Om oorblywende soute op te los is die DNA in 500 μ l 70% ETOH gespoel.
10. Na droging van die DNA (onder vakuum vir 15 min. of op die bank vir 30-60 min.) is die DNA in 300-500 μ l steriele H_2O opgelos, afhangende van die geskatte grootte van die DNA sediment.
11. Die DNA-konsentrasie is bepaal deur die absorbansie van die DNA-oplossing by 260 nm te meet en aan te neem dat een optiese digtheid by 260 nm gelyk is aan 50 μ g/ml DNA. Die suiwerheid van die DNA-monster is bepaal deur die verhouding A_{260}/A_{280} te bereken (Sambrook et al., 1989).

2.2.3. Polimerase ketting reaksie

Genomiese DNA wat uit bloedmonsters geïsoleer is, is geamplifiseer deur van die polimerase ketting reaksie (PKR) (Saiki et al., 1988) gebruik te maak. Amplifikasie is in alle gevalle in 'n totale reaksie-volume van 50 μ l uitgevoer wat ongeveer 0.5-1 μ g genomiese DNA, 1 eenheid (1E) *Taq* DNA-polimerase (Advanced Biotechnologies of Boehringer Mannheim), *Taq* DNA-polimerase buffer (Advanced Biotechnologies of Boehringer Mannheim, $MgCl_2$ ingesluit), 100 μ M van elkeen van die deoksinnukleosiedtrifosfate (dGTP, dTTP, dCTP, dATP) en 5-50 pmol van die voorvoeders bevat het.

TABEL 2-A. PKR-KONDISIES EN VOORVOERDERS WAT GEBRUIK IS VIR DIE AMPLIFIKASIE VAN EKSONS EN INTRONS VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN VIR MUTASIE-ANALISE, RFLP EN TA-HERHALENDE-DINUKLEOTIED STUDIES.

	Posisie	Voorvoeders	Nukleotiedvolgorde(5'→3')	PKR kondisies
Mutasie-analise	ekson 4 (3'-kant)	4.2 U	CGAGGCCTCCTGCCCGGTGCTCACC GGGACCCAGGGACAGGTGATAGGAC	20 pmol voorvoeders, 35 siklusse: 94°C (1 min.), 64°C (1 min.), 72°C (2 min.)
	ekson 4 (5'-kant)	H4A 4.3	GTGGTCTCGGCCATCCATCC GGGGTCGTTGTCGCAGGCCC	50 pmol voorvoeders, 35 siklusse: 94°C (1 min.), 63°C (1 min.), 72°C (2 min.)
	ekson 4 (AIMS)	4.2.1 4.5.1 4.7 U	CGAGGCCTCCTGCCCGGTGCTCTCC TGCGACAACGACCCCGACTGCGAAA CCCGCCCATACCGCAGTTTTCTCC GGGACCCAGGGACAGGTGATAGGAC	Sien afdeling 2.2.4.1
	ekson 9 (AIMS)	9.5 9.7	GCTCACCTGCAGATCATTCTCTGGG AGCCTCATCCCCAACCTGAGGA _{CCA}	Sien afdeling 2.2.4.1
	intron 7	H-7 J-7	GGCGAAGGGATGGGTAGGGG GTTGCCATGTCAGGAAGCGC	10 pmol voorvoeders, 30 siklusse: 94°C (1 min.), 57°C (1 min.), 72°C (2 min.)
RFLP studie	ekson 8	SP68 SP69	CCAAGCCTCTTTCTCTCTCTCCAG CCACCCGCCGCTTCCCGTGCTCAC	5 pmol voorvoeders, 35 siklusse: 94°C (1 min.), 64°C (1 min.), 72°C (2 min.)
	ekson 13	13.1 V	CCTTACCTCTTGGCTGGGTG GACAAAGTATTTGGACAGA	50 pmol voorvoeders, 35 siklusse: 94°C (1 min.), 56°C (1 min.), 72°C (2 min.)
	ekson 18	18.1 18.2	CACCTAGTGCTTCCACTTCTA TCCCGTCAAACGATCCAGACT	Tricine buffer*, 50 pmol voorvoeders, 25 siklusse: 93°C (1 min.), 49°C (2 min.), 72°C (2 min.)
	ekson 18	GZ-7 GZ-8	CACTTGTATATTGGTTGAACTGT CACTGAACA ⁴ ATACAGCAACCAGGG	100 pmol voorvoeders, 25 siklusse: 94°C (1 min.), 64°C (3 min.), 72°C (2 min.)
TA-herhalende-dinukleotied studie				

*Ponce & Micol, 1992

Die voorvoerdervolgordes word aangegee in tabel 2-A (Yamamoto et al., 1984). Alle reaksies is bedek met 100 µl ligte minerale-olie van Sigma en is daarna in 'n termiese sikliseerder (Omnigene, Hybaid) geamplifiseer. Verdere besonderhede van die polimerase ketting reaksies wat vir onderskeidelik die mutasie-analise, RFLP en TA-herhalende-dinukleotied studies van belang was, word kortliks in tabel 2-A opgesom.

Na amplifikasie is 'n tiende van die PCR-produkte op 2% agarose (FMC Bioproducts) gels geanaliseer na byvoeging van 5 µl Ficoll Orange G laaibuffer (0.1% Orange G, 20% Ficoll, 10 mM EDTA pH 7.0). Elektroforese is uitgevoer teen 80-100 V met die insluiting van 1 µg/ml etidiumbromied in 0.5 x TBE elektroforese buffer (0.445 M Tris, 0.445 M Boorsuur, 0.11 M EDTA pH 8.0). Na elektroforese is die DNA met ultravioletlig gevisualiseer en gefotografeer met polaroëdfilm.

2.2.4. Mutasie-analise van PCR-produkte

2.2.4.1. Die sifting van die Kleurlingpopulasie vir die FH Afrikaner-1, -2 en -3 mutasies deur gebruik te maak van die amplifikasie-inhiberende-mutasie-sisteem (AIMS)

DNA-monsters van heterosigotiese pasiënte, wat reeds vir die teenwoordigheid of afwesigheid van die FH Afrikaner-1, -2 en -3 mutasies (Kotze et al., 1991) getoets is, is gebruik in die standarisering van die gelyktydige opsporing van hierdie mutasies met die AIMS-PCR metode

(Newton et al., 1989). Drie algemene voorvoeders (4.2.1, 9.5, U), en drie AIMS-voorvoeders (4.7, 9.7, 4.5.1), wat spesifiek is vir die drie mutante allele, is gebruik om 39 hiperlipidemiese en 31 FH heterosigotiese Kleurlinge (TBH) vir die drie algemene FH-verwante Afrikanermutasies te toets. Die volgordes van beide die AIMS-voorvoeders en die algemene voorvoeders word in tabel 2-A aangetoon.

Sifting vir die FH Afrikaner-1 mutasie (Asp₂₀₆→Glu, sitosien na guanien by nukleotiedposisie 681) in ekson 4 van die LDL reseptor geen, is gedoen deur gebruik te maak van die 4.7 voorvoerder (mutante alleel) en die 4.2.1 voorvoerder. Die FH Afrikaner-2 mutasie (Val₄₀₈→Met, guanien na adenien by nukleotiedposisie 1285) in ekson 9 is ondersoek deur van die 9.7 (mutante alleel) en 9.5 voorvoeders gebruik te maak. Die onderstreepte basis by die 9.7 voorvoerder (tabel 2-A) dui aan dat die binding van hierdie basis gedestabiliseer is om alleelspesifisiteit te verseker. Daar is vir die FH Afrikaner-3 mutasie (Asp₁₅₄→Asn, guanien na adenien by nukleotiedposisie 523) getoets deur van die 4.5.1 voorvoerder (mutante alleel) en die U voorvoerder gebruik te maak. Die 4.2.1 voorvoerder tesame met die U voorvoerder het gedien om 'n interne kontrole PKR-produk van 330 bp te genereer.

Ongeveer 0.5 µg genomiese DNA is gebruik in die AIMS-PKR, tesame met 1 x *Taq* DNA-polimerase buffer (Boehringer Mannheim, MgCl₂ ingesluit), 1 eenheid (1E) *Taq* DNA-polimerase (voorsien deur Boehringer Mannheim) en

100 μM van elkeen van die deoksinukleosiedtrifosfate (dCTP, dTTP, dATP, dGTP) in 'n totale volume van 50 μl . Die konsentrasies van die voo voorders wat in die reaksie gebruik is, was as volg: 4.2.1 (25 pmol), 9.5 (10 pmol), U (100 pmol), 4.7 (50 pmol), 9.7 (10 pmol) en 4.5.1 (100 pmol). Die *Taq* DNA-polimerase van Boehringer Mannheim is eksklusief in die AIMS-PKR gebruik, aangesien onaanvaarbare nie-spesifieke bande verkry is wanneer amplifikasie met *Taq* DNA-polimerase van sommige ander vervaardigers gebruik is. Gliserol is teen 'n konsentrasie van 10% ingesluit, terwyl 1 mM Me_4NCl ook deel uitgemaak het van die reaksie-bestanddele. Reaksie-mengels is met ligte minerale-olie (Sigma, 100 μl) bedek en amplifikasie van die onderskeie fragmente is uitgevoer deur van die volgende kondisies gebruik te maak: denaturering by 94°C vir 5 min. is gevolg deur 2 amplifikasie-siklusse, nl. 1) 10 siklusse van 94°C vir 30 sekondes, 60°C vir 1 min., 72°C vir 1.5 min. en 2) 25 siklusse van 94°C vir 30 sekondes, 55°C vir 1 min, 72°C vir 1.5 min. Die PCR-produkte is op 3% Metaphor gels (FMC-produkte), wat vir 2-3 uur teen 80 V geëlektroforeer en daarna met 'n etidiumbromiedoplossing (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gekleur is, gevisualiseer.

2.2.4.2.Sifting vir bekende en onbekende mutasies in ekson 4 van die LDL reseptor geen deur heterodupleks-analise

Die meer 3'-geleë 330 bp interne kontrole fragmente van ekson 4 van die LDL reseptor geen soos verkry na AIMS-PKR in 23 FH heterosigote en 39 hiperlipidemiese individue wat normaal was vir die drie Afrikanermutasies, is

verder geanaliseer deur heterodupleks-analise (Keen et al., 1991) in hoë-resolusie poli-akrielamiedgels. Die 23 FH heterosigote is ook geanaliseer deur 'n meer 5'-geleë 220 bp fragment met die H4A en 4.3 voorvoeders (tabel 2-A) te amplifiseer en aan heterodupleks-analise te onderwerp. Die 117 hiperlipidemiese individue (GSH), waarvan 51 reeds getoets was vir die FH-Afrikaner mutasies, en 66 vir die eerste keer aan mutasie-analise onderwerp is, is met die 4.2 en U voorvoeders (tabel 2-A) geamplifiseer en daarna ook vir heterodupleksbandpatrone gesif. 'n Deelvolumen van die PCR-produkte (10 µl) is gemeng met 5 µl laaibuffer (95% formamied, 0.05% bromofenolblou, 0.05% xileen sianol, 20 mM EDTA) en geëlektroforeer by kamertemperatuur (<30°C) in 30 cm vertikale, 10% poli-akrielamiedgels met 'n dikte van 1 mm en 'n lae kruiskoppelingsverhouding van 1% (Peeters & Kotze, in druk). Ureum is teen 'n konsentrasie van 15% bygevoeg. Die gel is voorberei vanaf 'n 40% stooroplossing wat 40% akrielamied en 0.4% N,N'-bisakrielamied bevat het. Elektroforese is verder in 'n 0.6 x TBE buffer teen 150 V oornag uitgevoer, totdat die fragmente ten minste 25 cm gemigreer het. Om groot getalle monsters te sif, is daar opeenvolgend (tot soveel as drie keer) in dieselfde putjies gelaai. Voldoende tyd (15-30 min.) is toegelaat vir elektroforese om plaas te vind tussen die opeenvolgende laai van monsters. Die gel is vir 10 min. in 'n 0.6 x TBE oplossing, wat etidiumbromied teen 'n konsentrasie van 1 µg/ml bevat het, gekleur, waarna die DNA onder ultravioletlig gefotografeer is. Soortgelyke resultate is verkry met Hydrolink-MDE gels (Mutation Detection Enhancement, AT Biochem, Malvern, PA), wat

teen 'n 1 x konsentrasie van MDE-geloplossing voorberei is en waarby daar ook 15% ureum gevoeg is. Elektroforese-toestande was dieselfde. Om koste te bespaar (kommersieel beskikbare Hydrolink-geloplossing is baie duur) is heterodupleks-analise hoofsaaklik in die 1% kruiskoppeling, 10% poli-akrielamiedgels uitgevoer.

*2.2.4.3. Sifting van ekson 4 van die LDL reseptor geen vir
onbekende mutasies met die enkelstring-konformasie-
polimorfisme-metode (ESKP)*

Die nie-radio-aktiewe metode van Yap en McGee (1992) is gebruik om enkelstring-konformasie-polimorfismes (ESKP's) (Orita et al., 1989b) in ekson 4 van die LDL reseptor geen op te spoor. 'n Totaal van 22 Kleurling FH heterosigote en 45 hiperlipidemiese (GSH) Kleurlingindividue, wat normaal is vir die FH Afrikaner-1, -2 en -3 mutasies en wat geen abnormale bandpatrone getoon het tydens die heterodupleks-analise nie, is gebruik. 'n Deelvolumen van die PCR-produk (10 µl) is aan alkaliese denaturasie onderwerp deur 1 µl 0.5 M NaOH, 10 mM EDTA by te voeg en die monster by 42°C te plaas vir 5-10 min. Na die byvoeging van 5 µl laai-buffer (95% formamied, 0.05% bromofenolblou, 0.05% xileen sianol), is die monsters onmiddellik op ys geplaas om die DNA as enkelstringe te behou. Elektroforese is oornag uitgevoer teen 250-300 V in 0.6 x TBE by 'n temperatuur van 4-10°C. Die gelvoorbereiding is volgens dieselfde metode as die gels vir die heterodupleksifinding uitgevoer, met die uitsondering dat 10% ureum ingesluit

is, en die dikte van die gels van 0.5-1 mm gewissel het. Parallele eksperimente is uitgevoer deur ureum of in te sluit of uit te laat uit die geloplossing. Na voltooiing van elektroforese, is kleuring en fotografie gedoen soos reeds beskryf by heterodupleks-analise.

2.2.4.4. Direkte DNA volgorde bepaling

'n Pakket van Pharmacia Biotechnologies is gebruik om enkelstring-DNA voor te berei vanaf PKR-produkte vir volgorde bepaling. Die pakket maak gebruik van die ensiem, lambda eksonuklease, wat enkelstring-DNA vanaf 'n gefosforileerde 5'-terminus selektief verteer. Dus, om die selektiewe aksie van die ensiem te verseker, moet een string van die PKR-produk 'n 5'-terminale fosfaatgroep besit. Die DNA-templaar is voorberei deur amplifikasie met gefosforileerde voorvoeders, gevolg deur eksonuklease vertering (Pharmacia Biotechnologies pakket). Volgorde bepaling is gedoen met T7 DNA-polimerase volgens die voorskrifte van die vervaardiger (T7 Sequencing Kit, Pharmacia Biotechnologies). Geneste voorvoeders is so ver moontlik vir volgorde bepaling gebruik. Die produkte van die volgorde bepaling is geanaliseer op denaturerende poli-akrielamiedgels by 'n gemiddelde temperatuur van 45°C.

2.2.4.5.Sifting vir die 2.5 kb-delesie van eksons 7-8 in die LDL reseptor geen

In hierdie studie is gesif vir die bekende 2.5 kb-delesie van eksons 7-8 wat deur Henderson et al. (1988) vir die eerste keer in die Kleurlinge geïdentifiseer is.

2.2.4.5.1.Peilfragmente

Die rekombinante plasmied, pLDLR-3, is deur die ATCC (American Type Culture Collection) verskaf en behels 'n vollengte cDNA van die LDL reseptor geen. Die 1.05kb cDNA en die 0.32kb cDNA *Pst* I DNA-fragmente, wat voorberei is vanaf pLDLR-3 en gesubkloneer is in pBR322 (Langenhoven, 1989), is in hierdie studie gebruik.

2.2.4.5.2.Plasmied DNA ekstraksie

'n Enkele bakteriese kolonie is in 40 ml LB medium (10g Bakto-Tripton, 5g Bakto-Gisekstrak, 10g NaCl, per liter) wat die aangewese antibiotikum bevat (tetrasiklien - 10 µg/ml) geïnokuleer en oornag (18 uur) by 37°C geskud. Plasmiedekstraksies is uitgevoer deur van die QIAGEN plasmiedekstraksie pakket gebruik te maak (midi protokol).

2.2.4.5.3. Voorbereiding van peiler-DNA

'n Deelvolumen van die geëkstraheerde rekombinante pBR322-DNA is oornag verteer met 20 E *Pst* I by 37°C in 'n totale reaksie-volume van 20 µl. Elektroforese is uitgevoer deur van 'n 1% agarose gel gebruik te maak en die konsentrasies van die peilfragmente is geskat deur 'n konsentrasie-reeks (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 µg/µl faag lambda DNA) ook op die gel te laai. Nadat 0.3-0.5 µg geëkstraheerde plasmiede met 'n pakket van Promega (Magic DNA Clean-Up System) gesuiwer is, is 'n deelvolumen van die skoongemaakte monsters radio-aktief gemerk.

2.2.4.5.4. Radio-aktiewe merking van die 1.05 en

0.32 kb *Pst* I peilfragmente

Die twee peilfragmente, nl. 1.05kb (100 ng) en 0.32kb (60 ng) is saam in dieselfde buisie radio-aktief gemerk met [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (Amersham International, konsentrasie van 10 mCi/ml, spesifieke aktiwiteit 3000 Ci/mmol). Inkeeptranslasie is gedoen met 100 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP deur die pakket van BRL te gebruik. Die standaard protokol wat saam met die BRL pakket verskaf word, is gevolg. 'n Spesifieke aktiwiteit van 10^8 tpm/µg is verkry.

Die radio-aktief gemerkte peilers is van die vry nukleotiede geskei deur chromatografie op 'n klein kolom wat voorberei is deur Sephadex G-50 (medium) in 'n pasteurpipet met 2 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Tri-Natriumsitraat;

pH 7.4) te ewilibreer. Die DNA is geëlueer met 2 x SSC en 20 fraksies, teen drie druppels per fraksie, is in 1.5 ml mikrosentrifugebuisies opgevang. Die radio-aktiewe inhoud van die fraksies is met 'n sintillasieteller bepaal, waarna die fraksies wat die gemerkte peiler-DNA bevat, saamgevoeg is en die radio-aktiewe inhoud van 2 μ l bepaal is. Die spesifieke aktiwiteit van die gemerkte DNA kon daarna bepaal word.

2.2.4.5.5. Restriksie-endonuklease vertering van genomiese DNA en agarose gel- elektroforese

Genomiese DNA (5 μ g) van 10 nie-verwante FH heterosigote en 16 nie-verwante hiperlipidemiese Kleurlinge is oornag (16-20 uur) met 15 E *Nco* I restriksie endonuklease (3E/ μ g) verter by 37°C. Die reaksie-toestande wat gebruik is, was soos voorgeskryf deur die verspreider (New England Biolabs). Spermidien is bygevoeg tot 'n konsentrasie van 0.5 mM om die DNA te ontrol sodat dit makliker deur die restriksie endonuklease verter kan word. Na vertering is die kondensaat deur sentrifugasie (5 sekondes) versamel, waarna 5 μ l Ficoll Orange G laaibuffer bygevoeg is. Die DNA is vervolgens oornag in 'n 0.7% agarose gel, teen 30 V, in 1 x TBE buffer geëlektroforeer om die fragmente volgens grootte te skei.

2.2.4.5.6. Oordrag van DNA na nylonfilters

DNA-fragmente is na nylon filters oorgedra (Hybond N, Amersham) deur gebruik te maak van die Southern-kladtegniek (Southern, 1975), sonder om die DNA te depurineer. Die gels is vooraf in gedistilleerde water gespoel nadat hulle onder UV-lig gefotografeer is met polaroïedfilm en volgens 'n geskikte grootte met 'n steriele lemmetjie gesny is. Die DNA in die gelmatriks is in 0.5 M NaOH en 1.5 M NaCl gedenateer vir 1-2 uur. Neutralisasie is vir 1 uur uitgevoer met die volgende oplossing: 0.5 M Tris-HCl (pH 5.5), 3 M NaCl, 0.3 M Tri-Natriumsitraat. Kapillêre oordrag is met 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Tri-Natriumsitraat; pH 7.4) oornag uitgevoer. Die filters is daarna in gedistilleerde water gespoel, vir 5 min. met UV-lig bestraal en vir 30 min by 80°C gebak.

2.2.4.5.7. DNA:DNA hibridisasie en outoradiografie

Die DNA op die filters is met die peilfragmente gehibridiseer soos beskryf deur Jeffreys et al. (1977) met enkele veranderinge volgens Vandenplas et al. (1984). Die voor-hibridisasie wasse is as volg uitgevoer. Die filters is in 'n 3 x SSC oplossing by kamertemperatuur geplaas. Hierna is die filters vir 30 min. in 'n skudwaterbad (by 65°C) geïnkubeer in 'n voorafverhitte 3 x SSC oplossing. Die laaste voor-hibridisasie was is vir 60 min. by 65°C in 'n voorafverhitte oplossing van 3 x SSC en 10 x Denhardt's (100 x Denhardt's: 2% m/v Beeserumalbumien, 2% m/v Polivinielpirrolidoon tipe 360, 2% m/v Ficoll tipe 400) uitgevoer. Die filters is vervolgens oorgedra na die

voorafverhitte hibridisasie-oplossing wat bestaan het uit 3 x SSC, 10 x Denhardt's, 0.1% SDS en 50 µg/ml haringsperm-DNA in water. 'n Prehibridisasie-was van 30 min. by 65°C is uitgevoer.

Die peilfragmente is gedenateer by 100°C vir 5 min., waarna die hibridisasie vir 18-20 uur uitgevoer is in 10 ml hibridisasie-oplossing by 65°C.

Na hibridisasie is die filters in 'n oplossing van 3 x SSC, 10 x Denhardt's, en 0.1% SDS geplaas. Die filters is vervolgens vier keer vir 1 min. in die voorafverhitte oplossing by 65°C gewas en daarna tweekeer vir 30 min. Die lae soutkonsentrasie beperkende was is driemaal vir 20 min. by 65°C uitgevoer in 'n oplossing wat uit 0.5 x SSC en 0.1% SDS bestaan het.

Die filters is aan X-straalfilm (Kodak X-OMAT-AR) blootgestel vir twee dae by -70°C.

2.2.5. Restriksie-fragment-lengte-polimorfisme (RFLP) studie

Die PKR-toestande en oligonukleotiedvoorvoeders wat gebruik is om die onderskeie fragmente tydens die RFLP studie te genereer, is in tabel 2-A opgesom. PKR-produkte van 17 nie-verwante FH heterosigote en 21 nie-verwante kontrole individue is in hierdie studie geanaliseer. Die polimorfiese snyplekke wat ondersoek is, sluit in die volgende: *Sma* I (Jensen et al., 1994), *Stu* I (Kotze et al., 1986), *Ava* II (Hobbs et al., 1987) en *Nco* I (Kotze et al., 1987b). Vertering van die geskikte PKR-produkte is gedoen volgens die

verskaffers (New England Biolabs) se voorskrifte met 15 µl van die PKR-produkte wat met 8 eenhede (8 E) ensiem verteer is by 37°C vir 16-20 uur. Die totale volume was 20 µl.

DNA-fragmente is volgens grootte geskei op agarose gels soos aangedui in tabel 2-B.

TABEL 2-B. FRAGMENTGROOTTES GEGENEREER, VOOR EN NA RESTRIKSIE-ENDONUKLEASE VERTERING VAN DIE PKR-PRODUKTE, VIR DIE ONDERSOEK VAN VIER RFLP'S IN DIE LDL RESEPTOR GEEN EN DIE KEUSE VAN GELS VIR DIE VISUALISERING VAN DIE VERTERINGS.

Posisie	RFLP	Fragmentgroottes (bp)		Gel-elektroforese*
		onverteer	verteer	
Exon 7	<i>Sma</i> I	234	187 + 47	3% Metaphore
Exon 8	<i>Stu</i> I	174	134 + 40	3% Nusieve + 1% agarose
Exon 13	<i>Ava</i> II	148	111 + 37	3% Metaphore
Exon 18	<i>Nco</i> I	915	486 + 429	1.5% Agarose

* FMC Bioproducts

Die alleelfrekwensies van bg. RFLP's is in die FH heterosigotiese en kontrole populasies bepaal.

Tydens die RFLP studie, met die toetsing van ekson 18 PKR-produkte op 2% gels (*Nco* I polimorfisme studie) om te bepaal of amplifikasie suksesvol was, is daar in een FH heterosigoot 'n abnormale PKR-fragment van ongeveer 400 bp waargeneem, bykomend tot die normale PKR-produk van 915 bp. DNA volgorde bepaling is uitgevoer na suiwering van die mutante alleel as volg: Ekson 18 van FH 231 is geamplifiseer, waarna die PKR-produk op 'n 3.5% poli-akrielamiedgel (5% kruiskoppeling, 1.5 mm dik) in 1 x TBE teen 150 V oornag geëlektroforeer is. Na kleuring van die DNA-bande in 'n 1 x TBE

oplossing waarby etidiumbromied gevoeg is (1 $\mu\text{g/ml}$), is gelsnitte gemaak deurdat die mutante band van ongeveer 400 bp met 'n steriele lemmetjie uitgesny is en in 'n mikrosentrifugebuisie geplaas is. Die gelsnitte is vervolgens met 100 μl eluasie buffer (0.5 M ammoniumasetaat, 10 mM magnesiumasetaat, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1% SDS) bedek en by 4°C oornag gelaat. PCR met gefosforileerde ekson 18 voorvoorders is uitgevoer op 10 μl van die eluaat.

2.2.6. Statistiese berekeninge

Die χ^2 (χ^2)-toets is uitgevoer om vas te stel of die bestudeerde populasies in Hardy-Weinberg ewilbrium is en om chromosomale frekwensies te bepaal. Die PII waardes en % heterosigositeit is ook bereken.

2.2.7. Haplotipe studies

FH-geasscsieerde haplotipes is bepaal in pasiënte wat bekende LDL reseptor geen mutasies getoon het. Haplotipes is afgelei deur familiestudies, met die aanname dat geen rekombinasie plaasgevind het nie, en homosigositeit by die vier RFLP lokusse. Haplotipe afleidings (aantal en frekwensies van haplotipes) in die hipercholesterolemiese en kontrole populasies kon nie uitgevoer word nie, weens die gebrek aan beskikbaarheid van families en die feit dat heterosigositeit by die lokusse waargeneem is in die meeste individue.

2.2.8. TA-herhalende-volgorde-polimorfisme studie

In hierdie studie is 15 nie-verwante FH heterosigote en 15 nie-verwante kontrole individue ondersoek vir 'n polimorfiese dinukleotiedherhaling in ekson 18 by nukleotied 4780 (Zuliani & Hobbs et al., 1990).

2.2.8.1. Radio-aktiewe merking van oligonukleotiedvoorvoerder

Een van die voorvoeders wat gebruik is aan die DNA-segment in ekson 18 van die LDL reseptor geen, wat die TA-herhalende-volgordes oorspan, te amplifiseer, is met [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP radio-aktief gemerk. Endmerking aan die 5'-kant van die voorvoerder, met 100 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP, is m.b.v. bakteriofaag T4-polinukleotiedkinase (10 E, New England Biolabs) uitgevoer soos uiteengesit in Sambrook et al. (1989). Die voorvoerder (100 pmol) is saam met 2 μl 10 x bakteriofaag T4 polinukleotiedkinase buffer (New England Biolabs) en die [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP in 'n mikrosentrifugebuisie gevoeg. Die volume is na 20 μl opgemaak met gedistilleerde water. Die reaksie is vir 45 min. by 37°C geïnkubeer, waarna die ensiem vir 10 min. by 65°C geïnaktiveer is.

2.2.8.2. Polimerase ketting reaksie en gel-elektroforese

Die variasie tussen individue wat betref die lengte van die $(\text{TA})_n$ -herhalings is opgespoor deur PKR vermeerdering van die DNA met voorvoeders, GZ-7 en GZ-8 (sien tabel 2-A vir nukleotiedvolgordes), aan weerskante van die

herhalende volgordes, as volg: 'n totale reaksievolume van 50 μ l is gebruik wat bestaan het uit 100 μ M van elkeen van die deoksiribonukleosiede (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 1 E *Taq* DNA-polimerase (Boehringer Mannheim), 1 x *Taq* DNA-polimerase buffer (Boehringer Mannheim, $MgCl_2$ ingesluit), 100 pmol van elke oligonukleotiedvoorvoerder, een radio-aktief gemerk, en 0.5-1 μ g genomiese DNA-templaar. Die reaksie is met 100 μ l minerale-olie (Sigma) bedek en aan 25 amplifikasie-siklusse onderwerp, waartydens die templaar-DNA gedenateer is by 94°C vir 1 min., die voorvoeders aan die DNA gebind het by 64°C vir 3 min. en 'n verlenging plaasgevind het by 72°C vir 2 min. PCR-produkte is op 2% agarose gels getoets.

Die PCR-produkte is in 6% denaturerende poli-akrielamiedgels geëlektroforeer om die verskillende allele te identifiseer. Die PCR-produkte is gevisualiseer deur die vakuumgedroogde gels aan X-straalfilms (Kodak X-OMAT-R) oornag by kamertemperatuur bloot te stel. Die volgordeleer van bakteriofaag M13-DNA is as groottestandaard gebruik.

3. RESULTATE

3.1. *Mutasie-analise van PKR-produkte*

3.1.1. Sifting van die Kleurlingpopulasie vir die FH-Afrikaner-1, -2 en -3 mutasies deur gebruik te maak van die amplifikasie-inhiberende-mutasie-sisteem (AIMS)

'n Totaal van 31 FH heterosigotiese en 39 hiperlipidemiese Kleurlinge is gesif vir die bekende FH-Afrikaner-1 en -3 mutasies in ekson 4 (Kotze et al., 1989b; 1990) en die FH-Afrikaner-2 mutasie in ekson 9 (Kotze et al., 1989b) van die LDL reseptor geen deur middel van AIMS-PKR (Newton et al., 1989). Hierdie multipleks-AIMS word geïllustreer in Fig. 3-A. Die foto toon die alleliese differensiasie wat verkry is direk na PKR-vermeerdering en gelelektroforese van genomiese DNA vanaf individue normaal vir die drie mutasies (N), en heterosigoties vir die FH-Afrikaner-1, -2 en -3 (FH-1, -2 en -3) mutasies, onderskeidelik. DNA van 'n kontrole persoon toon 'n produk van 330 bp, soos vermeerder deur die interne kontrole voorvoeders (COMM 1 en COMM 3). PKR-vermeerdering van DNA vanaf FH-1, -2 en -3 heterosigote toon onderskeidelik die verwagte 285 bp, 100 bp en 257 bp fragmente. Teenwoordigheid van die 330 bp ekson 4 fragment (interne kontrole) in al die buisies dui aan dat amplifikasie in al die reaksies plaasgevind het. Oorblywende interne kontrole PKR-produkte van pasiënte wat nie die drie bekende mutasies getoon het nie, is vervolgens d.m.v. heterodupleks-analise

(afdeling 3.1.2) in poli-akrielamiedgels gesif vir onbekende mutasies in ekson 4 van die LDL reseptor geen.

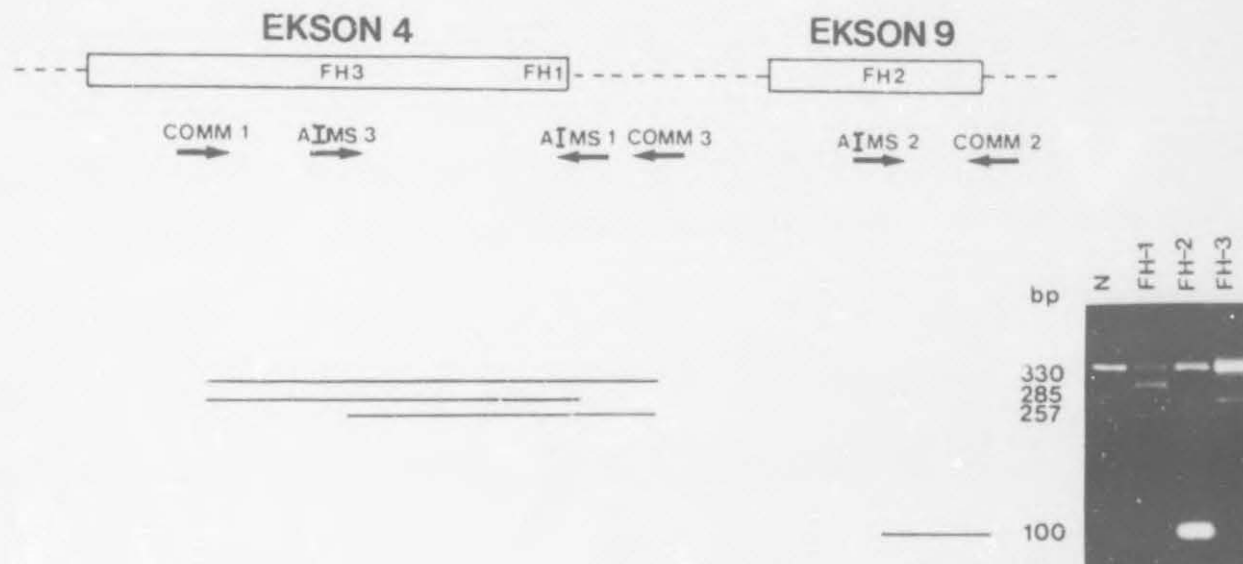


FIG. 3-A. ANALISE VAN DIE FH-AFRIKANER-1, -2 EN -3 (FH-1, -2 EN -3) MUTASIES DEUR MIDDEL VAN AIMS-PKR EN GEL-ELEKTROFORESE. DIE RELATIEWE POSISIES VAN DIE DRIE MUTASIES, DIE ALLEELSPESIFIEKE (AIMS) VOORVOERDERS EN DIE ALGEMENE (COMM) VOORVOERDERS WORD AANGEDUI OP DIE GEDEELTELIGE KAART VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN. DIE VIER LANE BEVAT, VAN LINKS NA REGS, GEAMPLIFISEERDE DNA VAN INDIVIDUE WAT NORMAAL IS VIR DIE DRIE MUTASIES, HETEROSIGOTIES IS VIR DIE FH-1 MUTASIE, HETEROSIGOTIES IS VIR DIE FH-2 MUTASIE EN HETEROSIGOTIES IS VIR DIE FH-3 MUTASIE, ONDERSKEIDELIK. DIE GROOTTES VAN DIE GEAMPLIFISEERDE PRODUKTE WORD AANGETOON IN BASISPARE (BP).

Die resultate van die sifting van die Kleurlingpopulasie vir die FH-1, -2 en -3 mutasies met AIMS-PKR word in tabel 3-A opgesom. Die FH-1 (Asp₂₀₆→Glu) mutasie is in vier nie-verwante individue aangetref. Vier pasiënte het die FH-2 (Val₄₀₈→Met) mutasie gehad. Alle pasiënte by wie daar 'n mutasie gevind is, was ook op kliniese vlak gediagnoseer as FH heterosigote. In hierdie studie is geen pasiënte met die FH-3 (Asp₁₅₄→Asn) mutasie gevind nie. In totaal het 25.8% van die Kleurling FH pasiënte dus een van die twee

algemeenste FH-Afrikaner mutasies getoon. Die mutasies was afwesig in die hiperlipidemiese groep.

TABEL 3-A. FREKWENSIES VAN DIE FH-AFRIKANER MUTASIES IN EKSON 4 EN EKSON 9 VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN SOOS BEPAAL MET AIMS-PKR IN 31 NIE-VERWANTE KLEURLINGE MET FH.

Mutasie	Aantal	Frekwensie (%)
Asp ₂₀₆ →Glu (FH-Afrikaner-1)	4	12.9
Asp ₁₈₄ →Asn (FH-Afrikaner-3)	0	0
Val ₄₀₈ →Met (FH-Afrikaner-2)	4	12.9

3.1.2. Sifting vir bekende en nuwe mutasies in ekson 4 van die LDL reseptor geen deur heterodupleks-analise

Heterodupleks-analise (Keen et al., 1991) van geamplifiseerde ekson 4 PKR-produkte is uitgevoer in 113 pasiënte by wie die bekende FH-Afrikaner mutasies reeds uitgeskakel is. 'n Verdere 66 hiperlipidemiese Kleurlinge, wat verkry is van die lipiedkliniek by GSH en wat nog nie vir die FH-Afrikaner mutasies getoets is nie, is ook vir ekson 4 mutasies (insluitende die FH-1 mutasie) gesif deur heterodupleks-analise. Fig. 3-B toon 'n verteenwoordigende foto van 'n heteroduplekssifting in 49 hipercholesterolemiese individue. Verskillende monsters is drie maal opeenvolgend in dieselfde lane gelaai. Een van die pasiënte wat in die tweede groep gelaai is (laan 7), het addisionele prominente bande getoon

identities aan 'n FH heterosigoot, nl. FH 792, wat op 'n vorige heterodupleksgel waargeneem is (resultate nie getoon). Die twee heterodupleksbande het stadiger as die normale DNA-band van 330 bp geëlektroforeer, volgens 'n patroon kenmerkend van klein delesies of insersies. Die migrasie-patroon van die DNA-band wat vinniger as die normale band geëlektroforeer het, het ooreengestem met dié van 'n mutante alleel (homodupleks) met 'n delesie.

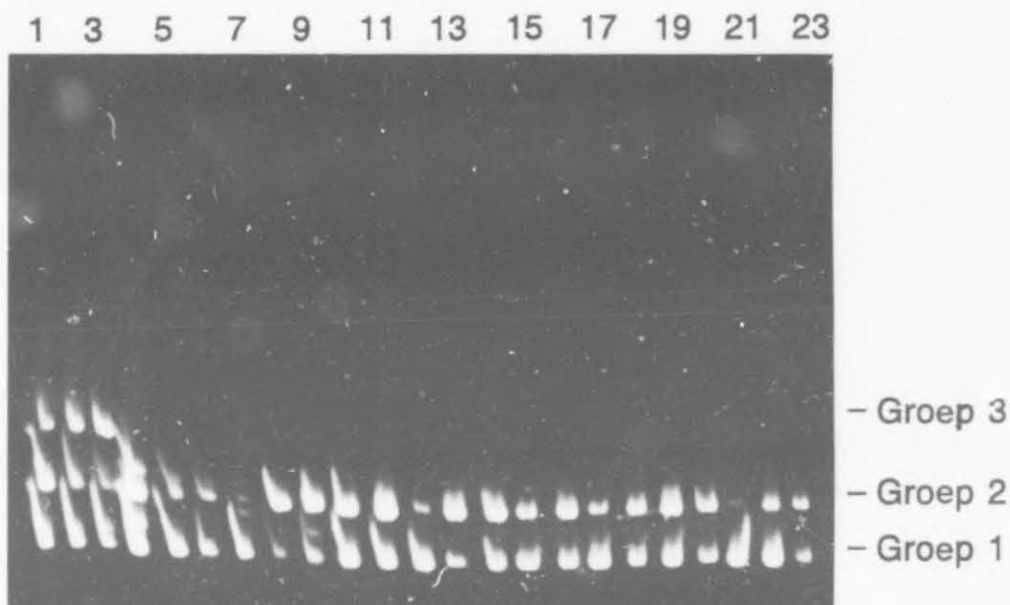


FIG. 3-B. ETHIDIUMBROMIED GEKLEURDE 10% POLI-AKRIELAMIEDGEL (1% KRUIKOPPELING) NA HETERODUPLEKS-ANALISE VAN DIE 330 BP PKR-PRODUKTE VAN 49 HIPERCHOLESTEROLEMIESE INDIVIDUE. DRIE GROEPE MONSTERS (GROEPE 1-3) IS OPEENVOLGEND IN DIESELFDE LANE GELAAI. DIE PKR-PRODUK VAN DIE INDIVIDU GELAAI IN LAAN 7 VAN DIE TWEDE GROEP, TOON HETERODUPLEKS- EN HOMODUPLEKS-BANDPATRONE KENMERKEND VAN 'N KLEIN DELESIE. KONTROLES VIR DIE FH-1 MUTASIE IS IN GROEPE 1 EN 2 IN LAAN 4 GELAAI EN WORD AANGEDUI DEUR 'N NORMALE BAND VAN 330 BP MET 'N MINDER INTENSE HETERODUPLEKS-BAND. DIE PKR-PRODUK VAN DIE INDIVIDU WAT IN LAAN 9 (GROEP 1) GELAAI IS, TOON DIESELFDE BANDPATROON AS DIE KONTROLES MET DIE FH-1 MUTASIE.

Kontroles vir die FH-1 mutasie is in beide die eerste en tweede groep in laan 4 van Fig. 3-B gelaai. In laan 9 van die groep wat eerste gelaai is, kan 'n duidelike heterodupleksband waargeneem word wat op dieselfde posisie in die gel migreer as die heterodupleksband van die FH-1 kontrole. Deur AIMS-PKR (Fig. 3-A) is bevestig dat hierdie individu heterosigoties is vir die FH-1 mutasie. Op soortgelyke wyse is nog vier van die 66 hiperlipidemiese individue (wat nog nie getoets was vir die drie FH-Afrikaner mutasies nie) geïdentifiseer as FH-1 heterosigote.



FIG. 3-C. AUTORADIOGRAM VAN 'N DNA-VOLGORDE-BEPALINGSGEL WAT DIE LDL RESEPTOR GEEN VOLGORDES AANTOON RONDOM DIE MUTASIE BY KODON 197 IN FH 792.

Dit het duidelik geblyk dat daar met die goedkoper heterodupleksgels vir die FH-1 mutasie gesif kon word in die Kleurlingpopulasie.

Direkte DNA volgorde bepaling van die PKR-produk van FH 792, het die teenwoordigheid van 'n bekende 3 bp delesie in kodon 197 van die LDL reseptor geen aangetoon (Fig. 3-C). Hierdie mutasie lei tot die eliminerings van glisien by posisie 197 en is vir die eerste keer deur Meiner et al. (1991) in die Ashkenazi Jode waargeneem. Hierdie sg. FH-Lithuania mutasie is in een FH pasiënt vanaf TBH se lipiedkliniek opgespoor, asook in twee pasiënte wat verkry is vanaf die GSH se lipiedkliniek.

PKR-produkte van die 22 FH heterosigote (TBH, sonder bekende mutasies) waarvan die meer 5'-geleë gedeelte van ekson 4 geamplifiseer is, is ook op heterodupleksgels geanaliseer, maar geen heterodupleksbande is waargeneem nie.

3.1.3. Sifting van ekson 4 van die LDL reseptor geen vir onbekende mutasies met die enkelstring-konformasie-polimorfisme-metode (ESKP)

PKR-produkte van pasiënte wat nie mutasies getoon het met die AIMS-PKR en heterodupleks-analise nie, is geanaliseer d.m.v. die enkelstring-konformasie-polimorfisme (ESKP) metode.

Fig. 3-D toon die ESKP-analise van gedenatureerde ekson 4 PKR-produkte (3'-kant) van 10 FH heterosigote, in 'n 0.75 mm dik nie-denaturerende 10% poli-akrielamied (1% kruiskoppelingsverhouding, 8°C) gel. In alle monsters kon twee enkelstringbande wat met die enkelstringe van die PKR-produk

korrespondeer, waargeneem word. Die dubbelstringbande wat vinniger as die enkelstringe gemigreer het, word ook aangedui op hierdie foto.



FIG. 3-D. ETHIDIUMBROMIED GEKLEURDE PKR-PRODUKTE (10 μ L) VAN 10 FH HETEROSIGOTE NA ALKALIESE DENATURASIE EN ANALISE VIR ENKELSTRING-KONFORMASIE-POLIMORFISMES OP 'N 0.75 MM DIK 10% POLI-AKRIELAMIEDGEL (1% KRUIKOPPELINGSVERHOUDING, 8°C). TWEE KENMERKENDE ENKELSTRINGBANDE WORD WAARGENEEM BY ELKE PASIËNT, BEHALWE FH 333 (LAAN 6) WAT 'N BYKOMENDE ENKELSTRINGBAND TOON. 'N ONGEDENATUREERDE KONTROLE IS IN LAAN 8 GELAAI.

By een van die pasiënte, FH 333 (laan 6), is 'n ESKP-patroon waargeneem.

Die abnormale bandpatrone is die gevolg van meer as twee konformasies wat die enkelstring-DNA kan inneem en dit is dus 'n goeie aanduiding van 'n moontlike mutasie aan die 3'-kant van ekson 4 in FH 333. Hierdie mutasie het voorgekom in slags 1 van die 22 FH heterosigote waarvan die 3'-kant van ekson 4 ondersoek is vir ESKP-bandpatrone.

Die ESKP-patroon van FH 333 is ook waargeneem op poli-akrielamiedgels met 10% ureum en 1% kruiskoppelingsverhouding (resultate nie getoon). Met die insluiting van 15% ureum in plaas van 10%, en met 'n hoër gelelektroforese temperatuur van 15°C in plaas van 4-10°C, kon FH 333 se ESKP bandpatroon egter nie waargeneem word nie.

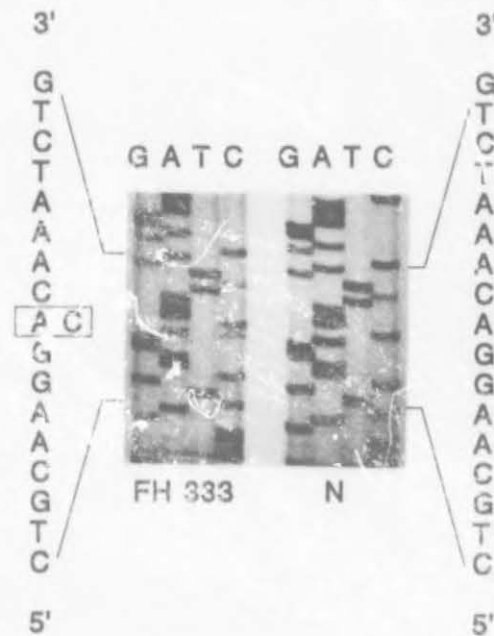


FIG. 3-E. OUTORADIOGRAM VAN DIE DIREKTE VOLGORDE BEPALING VAN DIE PCR-PRODUK VAN FH 333. AAN DIE LINKERKANT IS DIE DNA-VOLGORDE VAN FH 333 EN AAN DIE REGTERKANT DIE VOLGORDE VAN 'N NORMALE KONTROLE. UIT DIE DNA-VOLGORDE VAN FH 333 KON AFGELEI WORD DAT 'N A NA 'N C VERANDER HET EN DAT DIE PASIËNT HETEROSIGOTIES IS VIR HIERDIE PUNT MUTASIE.

Die resultate van die direkte volgorde bepaling van FH 333, word in Fig. 3-E aangetoon. Die A na C puntmutasie by nukleotiedposisie 671 het 'n

aspariensuur (GAC) na alanien (GCC) aminosuurverandering tot gevolg by kodon 203.

Hiërdie sg. FH-Tygerberg mutasie wat nog nie voorheen beskryf is nie, skep 'n setel vir die restriksie-endonuklease *Hae* III (normale opeenvolging GGAC, mutante volgorde GGCC). Die mutasie kon dus in die genoom bevestig word deur *Hae* III vertering van 10 µl geamplifiseerde produk van FH 333, soos aangetoon in Fig. 3-F. DNA-fragmente is volgens grootte geskei op 'n 20% poli-akriëlamiedgel (20 cm lank, 1.5 mm dik).

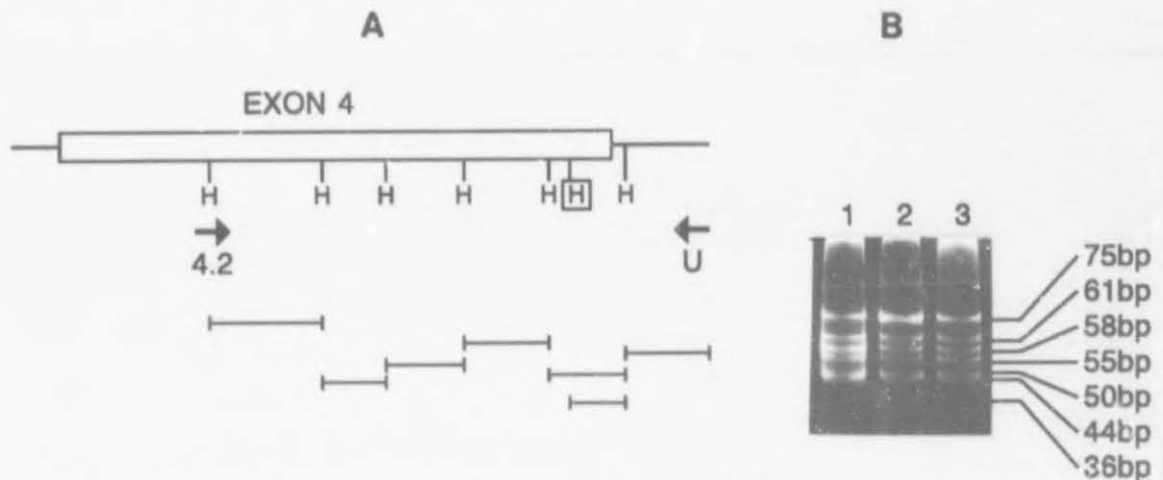


FIG. 3-F. GEL-ELEKTROFORESE VAN RESTRIKSIE-ENDONUKLEASE VERTERING VAN PCR-GEAMPLIFISEERDE EKSON 4 DNA VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN. DIE DIAGRAM TOON DIE 4H MUTASIE (A) AAN IN EKSON 4 VAN DIE GEEN, ASOOK DIE VERWAGTE FRAGMENTGROOTES NA *Hae* III VERTERING (B). *Hae* III VERTERING VAN PCR-PRODUKTE VAN FH 333 EN TWEE NORMALE KONTROLES (B): LAAN 1 EN 3, DNA VAN NORMALE KONTROLE INDIVIDUE. LAAN 2, DNA VAN FH 333.

Geen ESKP-bandpatrone is waargeneem nadat die PCR-produkte van die 5'-kant van ekson 4 van die 22 FH heterosigote op nie-denaturerende gels met en sonder ureum ondersoek is nie.

Die hiperlipidemiese groep (45 individue) het geen ESKP-bandpatrone op 10% poli-akrielamiedgels (1% kruiskoppelingsverhouding), waarby 10% ureum gevoeg is, getoon nie.

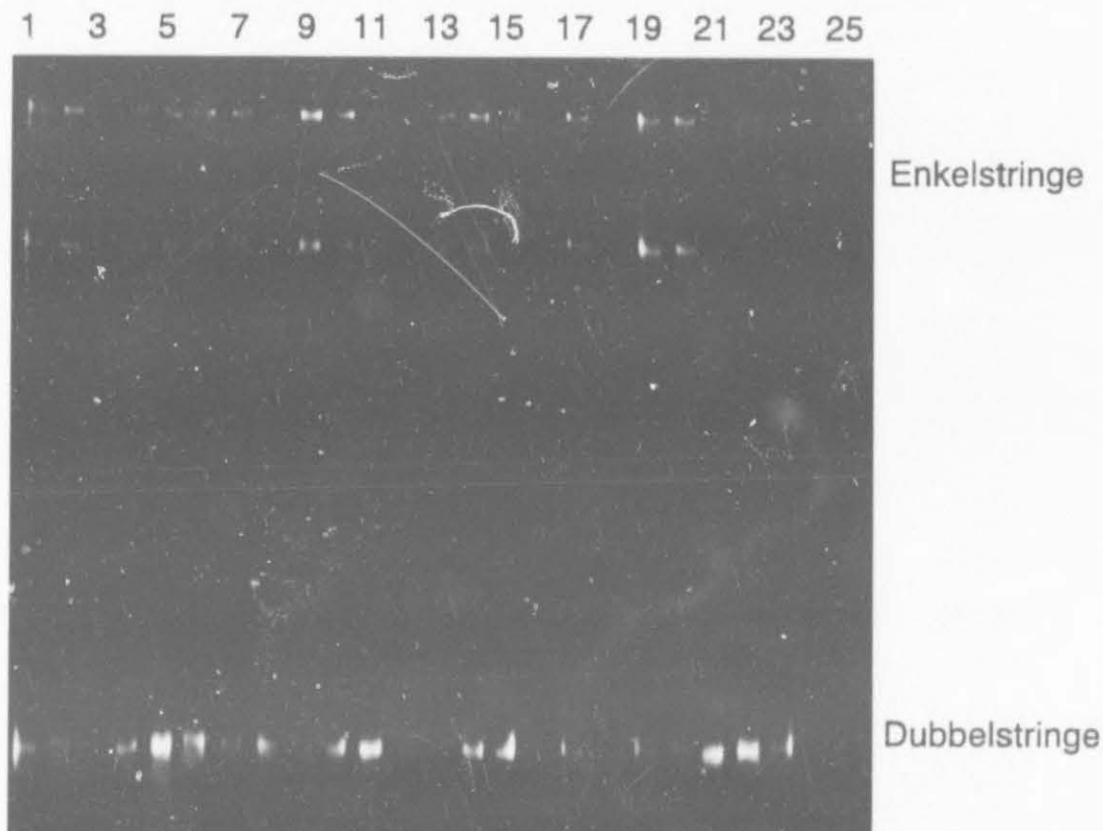


FIG. 3-G. ETHIDIUMBROMIED GEKLEURDE PCR-PRODUKTE VAN 22 FH HETEROSIGOTE WAT ALKALIES GEDENATUREER IS EN OP 'N 10% POLI-AKRIELAMIEDGEL (2.5% KRUISKOPPELING, 10% UREUM, 4°C) VIR ENKELSTRING-KONFORMASIE-POLIMORFISMES GEANALISEER IS. VIER PASIËNTE (LANE 1, 2, 4, EN 19) HET VALS ESKP-PATRONE AANGETOON WAT NIE HERHAALBAAR WAS NIE. PASIËNTE MET BEKENDE MUTASIES IS IN LAAN 20 (GLU₂₉₇→LYS) EN IN LAAN 23 (ASP₂₀₅→GLU) GELAAI

Die PCR produkte van vier pasiënte wat in lane 1, 2, 4 en 19 (Fig. 3-G) gelaai is op 'n 10% poli-akrielamiedegel (2.5 % kruiskoppelingsverhouding, 10% ureum, 4°C) het duidelike ESKP-patrone getoon. Hierdie patrone was egter

nie herhaalbaar in die ureum-heterodupleksgels nie en kon ook nie in Fig. 3-D (lane 1-4) of deur DNA volgorde bepaling bevestig word nie. Die afleiding is gemaak dat normale allele onder sekere toestande vals ESKP-bandpatrone kan toon. Kontroles vir die FH-1 en die Frans-Kanadese-3 (Glu₂₀₇→Lys) mutasies is ook op die gel in onderskeidelik laan 20 en laan 23 gelaai.

In tabel 3-B word 'n opsomming gegee van die tipe mutasies en die aantal wat in ekson 4 gevind is deur van die AIMS-PKR, heteroduplekssifting- en ESKP-metodes gebruik te maak.

TABEL 3-B. OPSOMMING VAN MUTASIES GEÏDENTIFISEER IN EKSON 4 VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN.

Mutasie	Aantal*
Asp ₂₀₆ →Glu (FH-Afrikaner-1)	9
Gly ₁₉₇ →del (FH-Lithuania)	3
Asp ₂₀₃ →Ala (FH-Tygerberg)	1

*Aantal mutasie-positiewe pasiënte geïdentifiseer in 'n totaal van 31 FH heterosigote (TBH se lipiedkliniek) en 117 hiperlipidemiese individue (GSH se lipiedkliniek).

3.1.4. Sifting vir die 2.5 kb delese van eksons 7-8 in die LDL reseptor geen

Genomiese DNA van 10 FH heterosigote en 16 hiperlipidemiese Kleurlinge is volledig met die ensiem *Nco* I verteer, aangesien dit geskikte fragmentgroottes lewer (Defesche, 1993) vir Southern-klad analise van die 2.5 kb delese, wat vir die eerste keer deur Henderson et al. (1988) beskryf is. Fig. 3-H toon 'n verteenwoordigende agarose gel en outoradiogram aan van die ondersoek van 8 individue vir die 2.5 kb-delese.

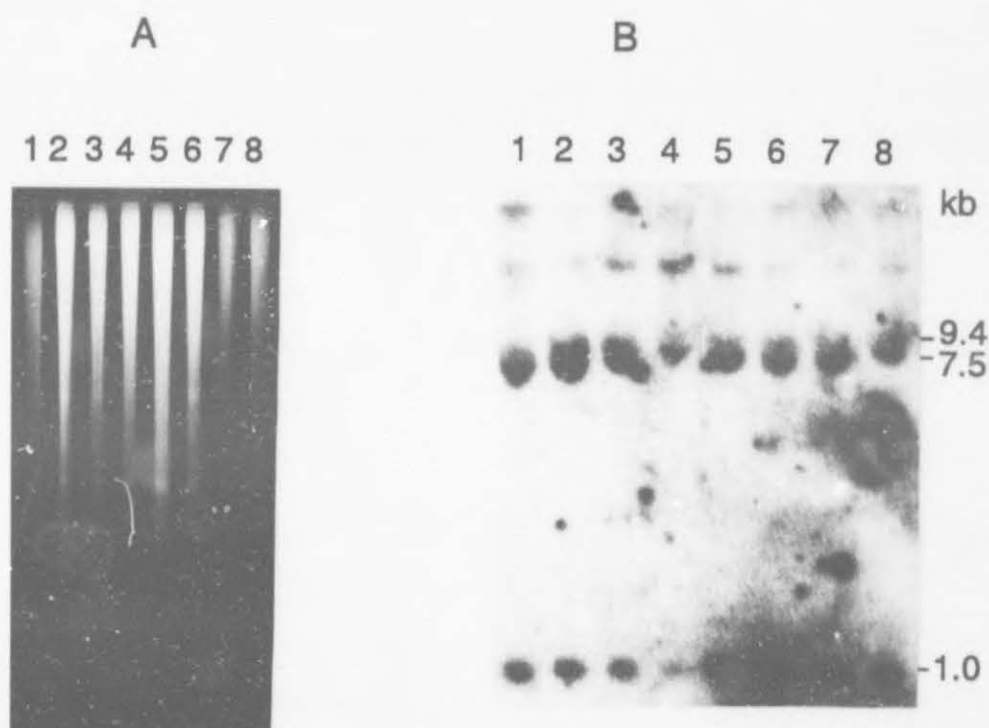


FIG. 3-H. ETHIDIUMBROMIED GEKLEURDE AGAROSE GEL (A) EN OUTORADIOGRAM (B) VAN GENOMIESE DNA VAN 8 INDIVIDUE NA VERTERING MET DIE RESTRIKSIE-ENDONUKLEASE *Nco* I EN HIBRIDISASIE MET DIE 0.32KB EN 1.05 KB cDNA PEILFRAGMENTE. GROOTTES WORD AANGEDUI IN KILOBASISPAAR (KB).

By al die individue in hierdie studie is die normale bandpatroon van *Nco* I verteerde genomiese DNA na hibridisasie en outoradiografie waargeneem. Die verwagte bande van 9.4, 7.5 en 1 kb is waargeneem en dit het dus geblyk dat nie een van die pasiënte die 2.5 kb-delesie dra nie.

3.2. Kliniese data

TABEL 3-C. KLINIESE DATA EN BIOCHEMIESE KENMERKE VAN NIE-VERWANTE FH HETEROSIGOTE MET VERSKEIE LDL RESEPTOR GEEN MUTASIES.

Mutasie	Pasiënt	Geslag/ Oud(j) ⁺	TC	LDLC	HDLC	TG	KHS [*]	XMTA [#]
				(mmol/L)				
Asp₂₀₅→Glu (FH-Afr.-1)	FH 1340	v/59	11.6	9.0	1.8	1.8	-	+
	FH 269	m/50	7.7	6.0	1.1	1.4	-	-
	FH 1085	m/59	10.2	8.6	1.3	0.7	+	+
	FH 1603	m/32	11.3	9.0	1.8	1.2	+	-
Val₄₀₈→Met (FH-Afr.-2)	FH 451	v/39	13.1	11.1	0.7	2.9	+	+
	FH 613	v/46	12.0	10.4	1.2	0.8	-	+
	FH 603	v/26	10.7	7.8	2.2	1.7	-	-
	FH 1255	v/32	8.84	6.9	1.3	1.5	+	-
Gly₁₉₇→del (FH-Lithuania)	FH 792	m/53	14.6	12.5	0.8	2.8	+	+
Asp₂₀₃→Ala (FH-Tygerberg)	FH 333	m/47	10.4	8.72	1.0	1.9	+	-

^{*} Koronêre hartsiekte

[#] Xantomas

⁺ Ouderdom in jare

Tabel 3-C toon die resultate van lipiedanalise en die teenwoordigheid van koronêre hartsiekte (KHS) en tendon xantomas aan in FH heterosigotiese pasiënte, in wie mutasies opgespoor is. 'n Positiewe familiegeskiedenis van KHS (miokardiale infarsie of skielike dood gerapporteer voor die ouderdom

van 50 jaar in eerste of tweede orde familie-lede) is deur al die indekspasiënte gerapporteer.

Uit bogenoemde tabel kan afgelei word dat die LDL reseptor geen mutasies wat geïdentifiseer is, verantwoordelik is vir FH in 32% (10/31) van die klinies geaffekteerde Kleurlinge. Kliniese data was nie beskikbaar vir die pasiënte vanaf die hiperlipidemiese groepe wat LDL reseptor geen mutasies getoon het nie.

FH 792, die pasiënt by wie die FH-Lithuania mutasie opgespoor is, het die hoogste totale cholesterolvlak gehad, nl. 14.6 mmol/L. Dit het geblyk dat die totale cholesterolvlak oor die algemeen hoër was in die pasiënte met die FH-2 mutasie (gemiddelde = 11.16) as wat waargeneem is vir individue met die FH-1 mutasie (gemiddelde = 10.2). Xantomata is waargeneem by die ouer pasiënte in die geval van die FH-1 en FH-2 mutasies. Kliniese tekens is nie in die ander individue waargeneem nie, waarskynlik omdat hulle jonger is en die kliniese tekens nog nie ontwikkel het nie.

3.3. *RFLP studie*

Die posisies in die LDL reseptor geen waar die vier varieerbare setels wat in hierdie studie geanaliseer is, geleë is, word in Fig. 3-1 aangedui. Die volgorde van die setels in die LDL reseptor geen is vanaf die 5'-kant: *Sma* I, *Stu* I, *Ava* II en *Nco* I. Twee van hierdie varieerbare setels is in die koderende streek geleë, nl. *Stu* I (ekson 8) en *Ava* II (ekson 13) en word veroorsaak deur

puntmutasies. Die polimorfiese *Nco* I setel is geleë in die 3' nie-koderende streek van ekson 18, terwyl die *Sma* I setel in intron 7 geleë is.

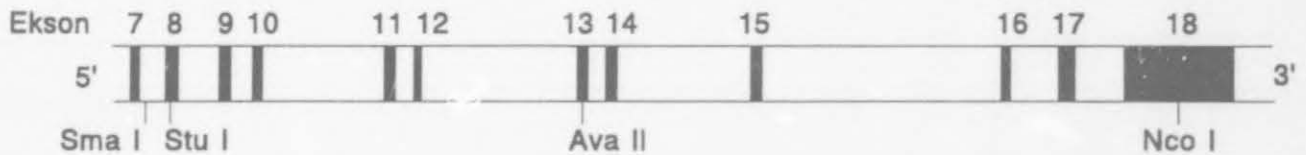


FIG. 3-I. KAART VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN OM AAN TE TOON WAAR DIE VIER POLIMORFIESE SETELS WAT IN HIERDIE STUDIE GEANALISEER IS, GELEë IS.

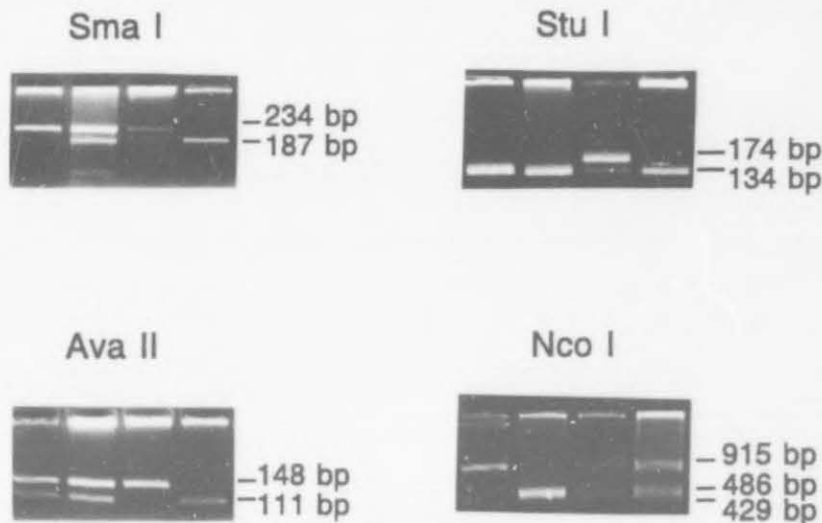


FIG. 3-J. RESTRIKSIE-ENDONUKLEASE ANALISE VAN DIE *SMA* I, *STU* I, *AVA* II EN *NCO* I RFLP'S IN DIE LDL RESEPTOR GEEN NA PKR-AMPLIFIKASIE EN GEL-ELEKTROFORESE. FRAGMENTGROOTTES WORD AANGEDUI IN BP.

Fig.3-J toon die verteenwoordigende agarose gels aan van die LDL reseptor geen fragmente wat waargeneem is nadat PKR-geamplifiseerde produkte van intron 7, ekson 8, ekson 13 en ekson 18 onderskeidelik met *Sma* I, *Stu* I, *Ava*

II en *Nco* I verteer is. Die PKR-kondisies en oligonukleotiedvoorvoeders wat gebruik is om die onderskeie fragmente tydens die RFLP studie te amplifiseer, word in tabel 2-A aangegee.

3.3.1. Haplotype studie in mutasie-positiewe FH pasiënte

Genotipes is bepaal vir die *Sma* I, *Stu* I, *Ava* II en *Nco* I LDL reseptor geen RFLP's na restriksie-endonuklease vertering van PKR-produkte, sodat die mutasie-geassosieerde haplotipes en oorsprong van die bekende mutasies vasgestel kon word.

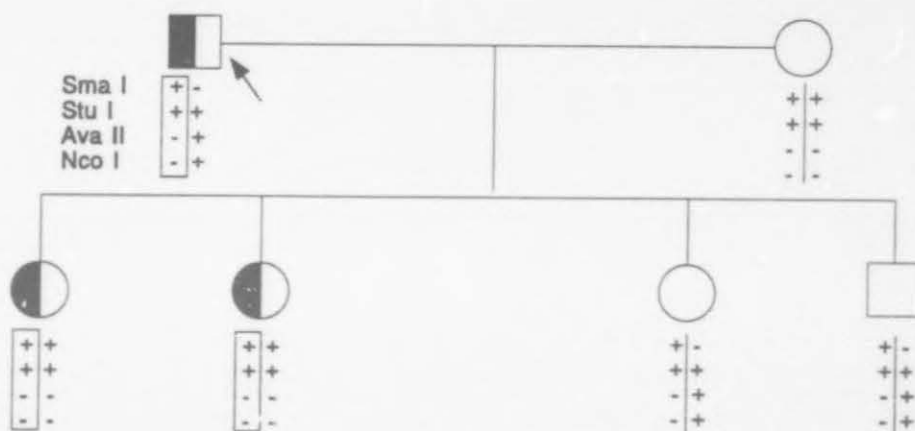


FIG. 3-K. HAPLOTYPE ANALISE IN DIE FAMILIE VAN FH 269 MET DIE FH-1 MUTASIE. AL VIER POLIMORFISMES IS BINNE DIE LDL RESEPTOR GEEN EN WORD GEANALISEER DEUR GEBRUIK TE MAAK VAN RESTRIKSIE-ENDONUKLEASE VERTERING VAN PKR-PRODUKTE. DIE TEENWOORDIGHEID VAN 'N RESTRIKSIE-ENDONUKLEASE SETEL WORD AANGEDUI MET 'N "+", EN DIE AFWESIGHEID VAN 'N SETEL WORD AANGEDUI MET 'N "-". HALFINGEKLURDE STAMBOOMSIMBOLE DUI GEAFFEKTEERDE INDIVIDUE MET DIE FH-1 MUTASIE AAN.

Hierdie RFLP's is gebruik om die oorerwing van allele van die LDL reseptor geen in familieleden van FH 269, FH 1085 en FH 613 te volg. Die familieleden van FH 792 was egter nie beskikbaar vir haplotipe studies nie. Die stamboom van eersgenoemde pasiënt en die haplotipe analise word aangetoon in Fig. 3-K. Dit is duidelik dat die haplotipe *Sma* I+, *Stu* I+, *Ava* II-, *Nco* I- saam met FH in die familie segregeer. FH 1085 en FH 613 was homoallelies vir al die polymorfismes en hulle haplotipes kon afgelei word.

Genotipering by die vier polymorfiese setels het getoon dat die FH-1 en FH-Lithuania mutasies wat in die Kleurlinge geïdentifiseer is, se geassosieerde haplotipes ooreenstem met die haplotipes wat reeds beskryf is in onderskeidelik die Afrikaner, Britse en Joodse populasies. Die FH-2 geassosieerde haplotipe verskil van dié in die Afrikaners by twee polymorfiese setels aan weerskante van die FH-2 mutasie.

TABEL 3-D. LDL RESEPTOR HAPLOTIPES GEASSOSIEER MET FH-VERWANTE MUTASIES IN VERSKILLENDE POPULASIES.

Mutasie	Haplotipe van die defektiewe LDL reseptor geen				Land van oorsprong
	<i>Sma</i> I	<i>Stu</i> I	<i>Ava</i> II	<i>Nco</i> I	
Asp ₂₀₈ →Glu (FH-1)	+	+	-	-	Brittanje
Val ₄₀₈ →Met (FH-2)	+	+	-	+	Suid-Afrika
Gly ₁₉₇ →del (FH-Lithuania)	+/-	+	+/-	-	Lithuania
Asp ₂₀₃ →Ala (FH-Tygerberg)	+/-	+	-	-	Suid-Afrika

"+" of "-" dui die aanwesigheid en afwesigheid, respektiewelik, van die snyplek aan. +/- dui aan dat dit nie moontlik was om die FH-geassosieerde alleel duidelik te bepaal nie.

Tabel 3-D som die haplotipe resultate op en gee ook die genotipe van FH 333 met die nuwe FH-Tygerberg mutasie. Famileiede was nie beskikbaar vir haplotipe studie t.o.v. die *Sma* I RFLP nie.

3.3.2. Die bepaling van RFLP genotipes en alleelfrekwensies in die FH en kontrole populasies

Die verspreiding van genotipes en alleelfrekwensies van die vier RFLP's is bepaal in beide die FH heterosigotiese populasie van 17 nie-verwante pasiënte (wat nie FH-verwante mutasies getoon het nie) en die kontrole populasie van 21 individue (tabel 3-E).

Die alleelfrekwensies is direk vanaf die genotipe-getalle bereken deur die aantal keer te tel wat elke alleel voorkom en dit dan te deel deur die totale aantal allele in die populasie. 'n Individue wat byvoorbeeld SM++ is, bevat twee SM+ allele, terwyl 'n individu wat SM+- is, slegs een SM+ alleel besit. Die aantal SM+ allele in die FH populasie sal bv. wees (sien tabel 3-E): $(2 \times 8) + 7 = 23$. Die totale aantal allele in die FH populasie is twee maal die aantal individue, nl. $17 \times 2 = 34$. Die SM+ alleelfrekwensie in die FH populasie sal dan byvoorbeeld bereken word as $23/34 = 0.68$.

Genotipes en alleelfrekwensies vir die *Sma* I, *Stu* I, *Ava* II en *Nco* I RFLP's word aangegee in tabel 3-E. Die plussteken (+) en minusteken (-) dui die teenwoordigheid of afwesigheid van die restriksie-endonuklease setel respektiewelik aan.

TABEL 3-E. VERGELYKING VAN DIE GENOTIPE VERSPREIDING EN ALLEELFREKWENSIES VAN DIE *Sma* I, *Stu* I, *Ava* II EN *Nco* I RFLP'S IN DIE FH EN KONTROLE POPULASIES.

Ensiem	Aantal individue			Alleelfrekwensies	
	SM++	SM+-	SM--	SM+	SM-
<i>Sma</i> I					
Kontrole (n=21)	12	9	0	0.79	0.21
FH (n=17)	8	7	2	0.68	0.32
<i>Stu</i> I	ST++	ST+-	ST--	ST+	ST-
Kontrole (n=21)	17	4	0	0.9	0.10
FH (n=17)	16	1	0	0.97	0.03
<i>Ava</i> II	Av++	Av+-	Av--	Av+	Av-
Kontrole (n=21)	0	9	12	0.21	0.79
FH (n=17)	3	6	8	0.35	0.65
<i>Nco</i> I	N++	N+-	N--	N+	N-
Kontrole (n=21)	13	8	0	0.81	0.19
FH (n=17)	10	5	2	0.74	0.26

'n Studie van die genotipe kombinasies van die vier RFLP's het aangetoon dat van die 256 moontlike genotipes (4^4) net 13 waargeneem kon word (Tabel 3-F). Genotipe kombinasies is direk vanaf die resultate van die restriksie-endonuklease verterings van PKR-produkte afgelei. Haplotipes is afgelei indien die individue homosigoties was vir ten minste drie van die vier polimorfismes. Dubbel heterosigote se haplotipes kon nie afgelei word nie, aangesien daar nie families bekikbaar was nie. Daar was 7 dubbel heterosigote in die FH populasie en 10 in die kontrole populasie (tabel 3-F). Van die 16 (2^4) moontlike haplotipes kon 6 in die FH populasie afgelei word en 4 in die kontrole populasie. Die haplotipe frekwensies is egter nie bereken nie, weens klein getalle en die gebrek aan families.

Die demonstreering van slegs 'n klein aantal genotipe kombinasies in die populasies kan geïnterpreteer word as nie-ewekansige assosiasie van die

vier DNA merkers in die LDL reseptor geen en is die gevolg van koppelingsdisekwilibrium tussen nabygeleë merkers.

TABEL 3-F. GENOTIPE FREKWENSIES VAN DIE VIER POLIMORFISMES VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN IN DIE KONTROLE EN FH POPULASIES SOOS BEREKEN IN PASIËNTE SONDER BEKENDE MUTASIES.

Genotipe	FH individue (n = 17)		Kontrole individue (n = 21)	
	Nr	%	Nr	%
S+ ST+ A- N-	1	6	0	0
S+ ST+ A- N+	4	24	4	19
S+/- ST+ A+/- N+	2	12	5	23.8
S+/- ST+ A+/- N+/-	2	12	3	14.3
S+ ST+/- A- N+	1	6	3	14.3
S+/- ST+ A- N-	1	6	0	0
S+ ST+ A+/- N+/-	1	6	0	0
S+/- ST+ A+ N+/-	1	6	0	0
S+/- ST+ A- N+/-	1	6	1	4.8
S+ ST+ A+/- N+	1	6	1	4.8
S- ST+ A+ N+	2	12	0	0
S+ ST+ A- N+/-	0	0	3	14.3
S+ ST+/- A- N+/-	0	0	1	4.8

3.3.2.1. Die Hardy-Weinberg ewwilibrium

In 'n populasie neig die relatiewe frekwensies van verskillende allele om konstant te bly van een generasie na die volgende. In 'n lokus met twee allele, A en a, kan die alleelfrekwensie van die A alleel, wat p genoem kan word, en die alleelfrekwensie van die a alleel, wat q genoem kan word, bereken word. Aangesien elke individu in 'n populasie óf die een óf die ander alleel moet hê, moet die som van hierdie alleelfrekwensies altyd een wees of 100%. Die genotipe frekwensies word bereken deur die binominale uitbreiding van $(p + q)^2$ soos aangedui:

$$\begin{array}{ccccccccc}
 (p + q)^2 & = & p^2 & + & 2pq & + & q^2 & = & 1 \\
 A & a & AA & Aa & aa & & & &
 \end{array}$$

waar die allele en genotipes waarmee die frekwensies korreleer in die tweede lyn aangegee word. Die som van die alleelfrekwensies, en van die genotipe frekwensies, moet altyd 1 wees. Hierdie verwagte verhouding tussen die frekwensies van allele in 'n populasie en die frekwensies van die genotipes in dieselfde populasie, staan bekend as die Hardy-Weinberg ewilibrum. Omdat die Hardy-Weinberg ewilibrum die verwagte verhoudings tussen die sigotiese-en geenfrekwensies verteenwoordig, dien dit as basis vir die uitvoer van statistiese toetse.

Die verspreiding van homosigote en heterosigote by elke setel (Tabel 3-E) was konsekwent met die Hardy-Weinberg ewilibrum, soos bereken uit bogenoemde.

3.3.2.2. Die chi-kwadraat (χ^2) toets

Om te bepaal of die alleelfrekwensies wat in tabel 3-E verkry is deur kans alleen voorkom, is die chi-kwadraat toets uitgevoer. Die veronderstelling wat geld met die uitvoer van die toets is dat $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Die χ^2 funksie is

$$\chi^2 = \Sigma(W - V)^2/V$$

waar Σ beteken "som van" en toepasbaar is op alle klasse in die eksperiment, W is die waargenome frekwensies en V is die verwagte frekwensies uitgedruk

as getalle. Indien die waargenome en verwagte frekwensie nie statisties beduidend van mekaar verskil nie, voldoen die twee allele van elke polimorfiese setel aan die Hardy-Weinberg verwagting van onafhanklike verspreiding van Mendeliese elemente. Of anders gestel, indien die verskille nie statisties beduidend is nie, is die waarskynlikheid (P) hoog dat die verskille toevallig is. Tabel 3-G toon hoe die data vir die uitvoer van die chi-kwadraat toets verwerk is. In elke row is die verwagte getalle vanaf die waargenome genotipe frekwensies apart vir elke RFLP bereken.

TABEL 3-G. VERWERKING VAN DIE DATA VIR DIE χ^2 -TOETS IN DIE FH (N = 17) EN KONTROLE (N = 21) POPULASIES.

Populasie	Genotipe	Alleel-frekwensie	Genotipe moontlik	v^* (verwag)	w (waargeneem)	$(w-v)^2/v$
FH	SM++	p = 0.68	0.4624	7.86	8	0.0025
	SM+-		0.4352	7.4	7	0.022
	SM--	q = 0.32	0.1024	1.74	2	0.04
						$\chi^2 = 0.065$
						P < 0.8
Kontrole	SM++	p = 0.79	0.6241	13.1	12	0.092
	SM+-		0.3318	6.96	9	0.6
	SM--	q = 0.21	0.0441	0.926	0	0.926
						$\chi^2 = 1.62$
						P < 0.2
FH	ST++	p = 0.97	0.941	15.9	16	0.0006
	ST+-		0.058	0.98	1	0.0004
	ST--	q = 0.03	0.0009	0.015	0	0.015
						$\chi^2 = 0.016$
						P < 0.9
Kontrole	ST++	p = 0.90	0.81	17.01	17	6E-6
	ST+-		0.18	3.78	4	0.013
	ST--	q = 0.10	0.01	0.21	0	0.21
						$\chi^2 = 0.22$
						P < 0.9

FH	A ⁺ ++	p = 0.35	0.1225	2.08	3	0.41
	A ⁺ +-		0.455	7.735	6	0.39
	A ⁺ --	q = 0.65	0.4225	7.18	8	0.09
					$\chi^2 =$	0.89
						P < 0.5
Kontrole	A ⁺ ++	p = 0.21	0.0441	0.92	0	0.92
	A ⁺ +-		0.3318	6.9	9	0.64
	A ⁺ --	q = 0.79	0.6241	13.1	12	0.09
					$\chi^2 =$	1.63
						P < 0.2
FH	N ⁺ ++	p = 0.74	0.5476	9.31	10	0.05
	N ⁺ +-		0.3848	6.5	5	0.35
	N ⁺ --	q = 0.26	0.0676	1.15	2	0.63
					$\chi^2 =$	1.03
						P < 0.3
Kontrole	N ⁺ ++	p = 0.81	0.6561	13.7	13	0.04
	N ⁺ +-		0.3078	6.46	8	0.37
	N ⁺ --	q = 0.19	0.0361	0.758	0	0.758
					$\chi^2 =$	1.168
						P < 0.3

*Bereken deur die moontlike genotipe frekwensies te vermenigvuldig met die totale aantal individue geanaliseer.

Die Chi-vierkant van hierdie berekeninge het 'n enkele graad van vryheid, aangesien die frekwensie van die allele geen teoretiese verwagting het nie, dus moet p (en gevolglik $q = 1-p$) vanaf die waarnemings bereken word. Een vryheidsgraad gaan verlore vir elke parameter (p in hierdie geval) wat van die data bereken moet word. Uit tabel 3-G is dit duidelik dat daar bevredigende ooreenstemming tussen waargenome en verwagte resultate is ($\chi^2_{(1)0.05} = 3.84$). Al die berekende χ^2 -waardes is minder as die chi-vierkantwaarde vir een graad van vryheid by die 5% vlak van beduidendheid, wat 3.84 is. Of anders gestel: die resultate blyk om te voldoen aan Mendel se hipotese en

dat die verskil tussen die waargenome en verwagte waardes aan kans te wyte is.

Die χ^2 -toets is ook uitgevoer om te bepaal of die verskille in alleelfrekwensies tussen die FH en kontrole populasies (tabel 3-E) statisties betekenisvol is. Die kontrole populasie se alleelfrekwensies is gebruik om die verwagte getalle in die FH populasie vir elke RFLP te bereken. Op hierdie manier is aangetoon dat daar 'n statisties beduidende verhoging is in die skaars alleel van die *Ava* II polimorfisme in die FH groep (alleelfrekwensie van + alleel = 0.35) in vergelyking met die kontrole groep (alleelfrekwensie van + alleel = 0.21) ($\chi^2 = 7.42$, 1 vryheidsgraad, $P < 0.01$). Dit is 'n moontlike aanduiding van populasie assosiasie van hierdie alleel met 'n mutasie in die LDL reseptor geen wat FH veroorsaak.

Wat die *Stu* I, *Nco* I en *Sma* I RFLP's betref, is daar geen statisties beduidende verskil in die alleelfrekwensies tussen die FH en kontrole populasies gevind nie.

3.3.2.3. Die berekening van heterosigositeit (H) en polimorfiese informasie inhoud (PII)

'n Goeie maatstaf van genetiese variasie is die frekwensie van heterosigotiese individue per lokus. Dit staan ook bekend as die heterosigositeit (H) van die populasie en is dus 'n aanduiding van hoeveel individue in 'n populasie 'n verskil toon tussen die allele. Tabel 3-H toon die

resultate aan nadat die heterosigositeit bereken is vir die vier RFLP-loki wat in die studie gebruik is.

TABEL 3-H. BEREKENING VAN DIE HETEROSIGOSITEIT BY DIE VIER RFLP LOKI VIR DIE KONTROLE EN FH POPULASIES.

Lokus	RFLP	Aantal individue		Heterosigositeit (%)
		Heterosigote	Totaal	
Kontrole populاسie				
Intron 7	<i>Sma</i> I	9	21	42.80
Ekson 8	<i>Stu</i> I	4	21	19.04
Ekson 13	<i>Ava</i> II	9	21	42.80
Ekson 18	<i>Nco</i> I	8	21	38.09
			gemiddelde =	35.60
FH populاسie				
Intron 7	<i>Sma</i> I	7	17	41.17
Ekson 8	<i>Stu</i> I	1	17	5.80
Ekson 13	<i>Ava</i> II	6	17	35.29
Ekson 18	<i>Nco</i> I	5	17	29.40
			gemiddelde =	27.90

Behalwe vir die *Stu* I RFLP wat lae heterosigositeit toon, is die genetiese variasie by die ander drie loki redelik hoog, met heterosigositeite wat wissel tussen 29.4% en 41.17% in die FH populasie en 38.09% en 42.8% in die kontrole populasie. Die *Sma* I polimorfisme het die hoogste heterosigositeitswaardes gehad in die FH populasie en daarna die *Ava* II setel.

Behalwe die alleelfrekwensies is daar 'n ander maatstaf wat gebruik kan word om die bruikbaarheid van 'n polimorfiese lokus vir koppeling te bepaal (Botstein et al., 1980). Hierdie maatstaf staan bekend as die polimorfiese informasie inhoud (PII) van 'n lokus en word gebruik om die relatiewe

informatie inhoud van 'n merker lokus uit te druk. Die PII is 'n funksie van die aantal allele by 'n gegewe merkerlokus en die allele se frekwensies in die populasie. Die PII word bereken as

$$1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i-1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

waar n die aantal allele is en p die frekwensies van die allele. Die PII maatstaf verskaf inligting aangaande die waarskynlikheid dat die ouerlike oorsprong van die oorgeërfde allele bepaal kan word as die individu en sy ouers se genotipes bekend is (Barker et al., 1984).

Tabel 3-I is 'n opsomming van die berekende PII waardes by die vier RFLP loki.

TABEL 3-I. DIE PII WAARDES BY VIER RFLP LOKI (*Sma* I, *Stu* I, *Ava* II, *Nco* I) IN DIE FH EN KONTROLE POPULASIES.

	Lokus	RFLP	PII
Kontrole populasie	Intron 7	<i>Sma</i> I	0.2767
	Ekson 8	<i>Stu</i> I	0.1638
	Ekson 13	<i>Ava</i> II	0.2767
	Ekson 18	<i>Nco</i> I	0.2604
FH populasie	Intron 7	<i>Sma</i> I	0.3405
	Ekson 8	<i>Stu</i> I	0.0566
	Ekson 13	<i>Ava</i> II	0.3514
	Ekson 18	<i>Nco</i> I	0.3107

Die PII waardes vir die vier RFLP loki het gewissel tussen 0.16 en 0.27 vir die kontrole populasie en tussen 0.05 en 0.35 vir die FH populasie. Die PII waardes vir die *Stu* I polimorfisme was die laagste in beide populasies.

3.3.3. Die identifikasie van 'n 478 bp deleisie in ekson 18 van die LDL reseptor geen

DNA-monsters van 17 FH heterosigote is tydens die RFLP studie met die voorvoeders 18.1 en 18.2 (sien tabel 2-A vir nukleotiedvolgordes) geamplifiseer om PKR-produkte van 915 bp lank te produseer, wat daarna met *Nco* I verteer is vir analise van die *Nco* I polimorfisme in ekson 18. Die PKR-produkte is op 2% agarose gels gevisualiseer om te toets of die PKR suksesvol was. Een van die pasiënte, nl. FH 231, het addisioneel tot die normale 915 bp PKR-produk ook 'n bykomende fragment van ongeveer 400 bp (geskat volgens grootte merker VI) getoon, wat baie sterk onder UV-lig gefluoresseer het (Fig.3-L). Dit is 'n aanduiding dat FH 231 een normale ekson 18 geamplifiseerde fragment het en een fragment wat blykbaar ontstaan het a.g.v. 'n deleisie van ongeveer 500 bp (met pyl gemerk, Fig.3-L).



FIG. 3-L. ETHIDIUMBROMIED GEKLEURDE 2% AGAROSE GEL OM TE TOETS VIR DIE SUKSESVOLLE PKR AMPLIFIKASIE VAN DIE GENOMIESE DNA VAN 6 FH HETEROSIGOTE VOORDAT RESTRIKSIE-ENDONUKLEASE ANALISE VAN DIE *Nco* I RFLP IN EKSON 18 VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN UITGEVOER KON WORD. DIE INDIVIDU IN LAAN 2 HET BYKOMEND TOT DIE NORMALE BAND VAN 915 BP, OOK 'N ABNORMALE BAND MET 'N GESKATTE GROOTTE VAN ONGEVEER 400 BP (PYL) GETOON.

DNA volgorde bepaling is uitgevoer na suiwering van die mutante alleel. Op hierdie manier kon die 5'- en 3'-delesie-breekpunte bepaal word, asook die presiese grootte van die delesie. Fig. 3-M toon die resultate van die volgorde bepaling van die mutante alleel van FH 231 en van die PKR-produk van 'n normale kontrole. Uit Fig. 3-M is dit duidelik dat die DNA-volgorde in FH 231 'n perfekte ooreenkoms toon met die normale volgorde to by nukleotied 3749. Vanaf nukleotied 3749 (die einde van die eerste direkte herhaling) verskil die DNA-volgorde van FH 231 van dié van die normale kontrole. Vergelyking van die DNA-volgorde van die abnormale band met die gepubliseerde cDNA volgorde (Yamamoto et al., 1984) het getoon dat die 5'-delesie-breekpunt in ekson 18 geleë is óf voor óf na 'n kort nukleotiedvolgorde wat in die eerste *Alu* herhalende volgorde in die 3'-ongetransleerde streek van die LDL reseptor geen voorkom. Die nukleotiedvolgorde het 'n lengte van 34 bp en strek vanaf nukleotied 3715 tot by nukleotied 3749. Die 3'-aansluitingspunt kon ook óf voor óf na 'n identiese nukleotiedvolgorde, wat in die derde *Alu* herhalende volgorde van die ongetransleerde DNA voorkom, plaasgevind het. Die tweede identiese volgorde strek vanaf nukleotied 4193 tot by nukleotied 4227.

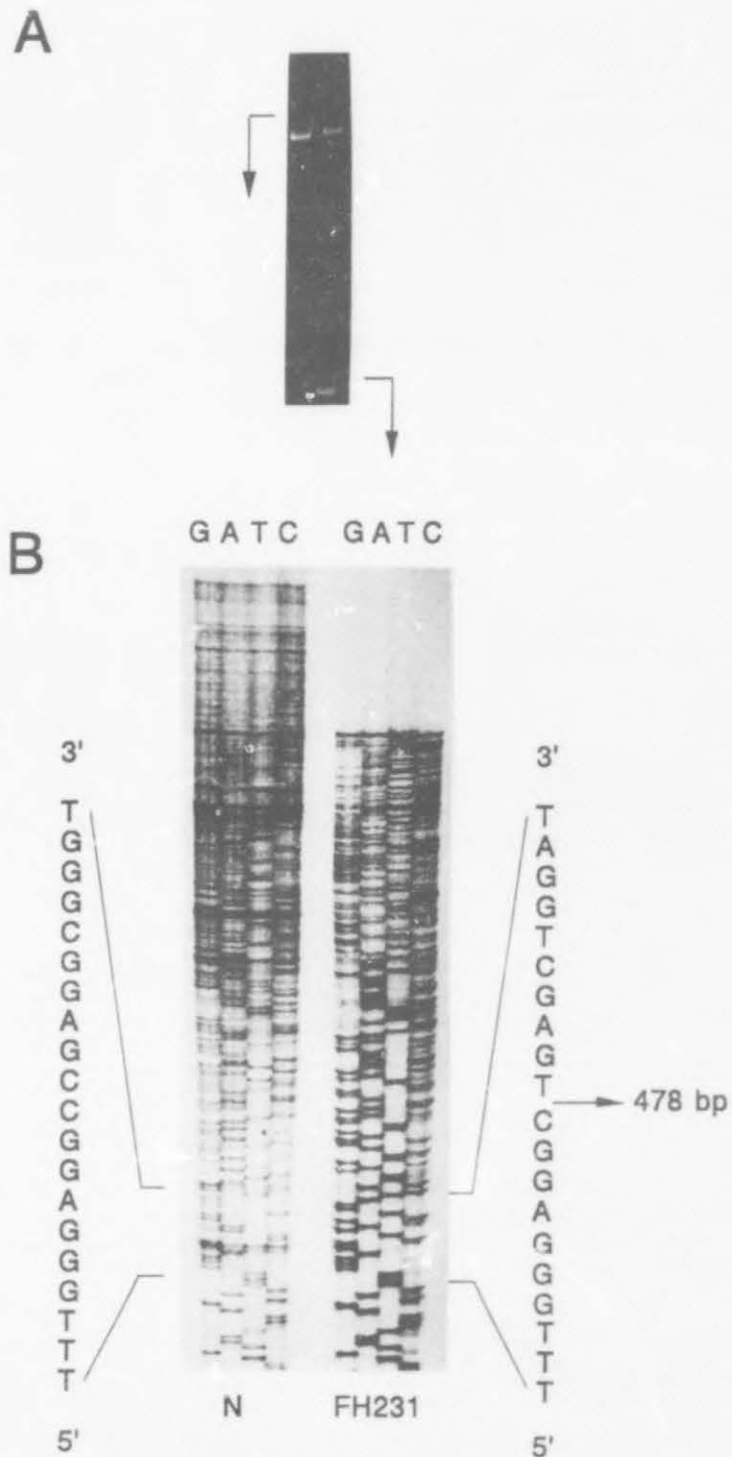


FIG. 3-M. ETHIDIUMBROMIED GEKLEURDE POLI-AKRIELAMIEDGEL (3.5%) (A) EN DNA VOLGORDE BEPALING (B) VAN DIE MUTANTE ALLEEL VAN FH 231 (REGS) EN VAN DIE PCR-PRODUK VAN 'N NORMALE KONTROLE (LINKS). DIE DNA-VOLGORDE OOR DIE DELESIE-AANSLUITINGSPUNT ("DELETION JOINT") IN DIE MUTANTE ALLEEL VAN FH 231 EN DIE OOREENSTEMMENDE GEDEELTES IN DIE NORMALE GEEN WORD AANGEÏK. DIE HOMOLOGIE TUSSEN DIE NORMALE EN MUTANTE VOLGORDES WORD BEÏNDIG NA NUKLEOTIEDPOSISIE 3749 SOOS AANGEDUI MET DIE PYL

Die verhouding van die deleisie-eindpunte in FH 231 se DNA tot die *Alu* volgorde word diagrammatis voorgestel in Fig. 3-N, waaruit dit duidelik is dat beide die 5'-en 3'-deleisie breekpunte voorkom in die linkerarms van die twee *Alu* herhalende volgordes wat betrokke is.

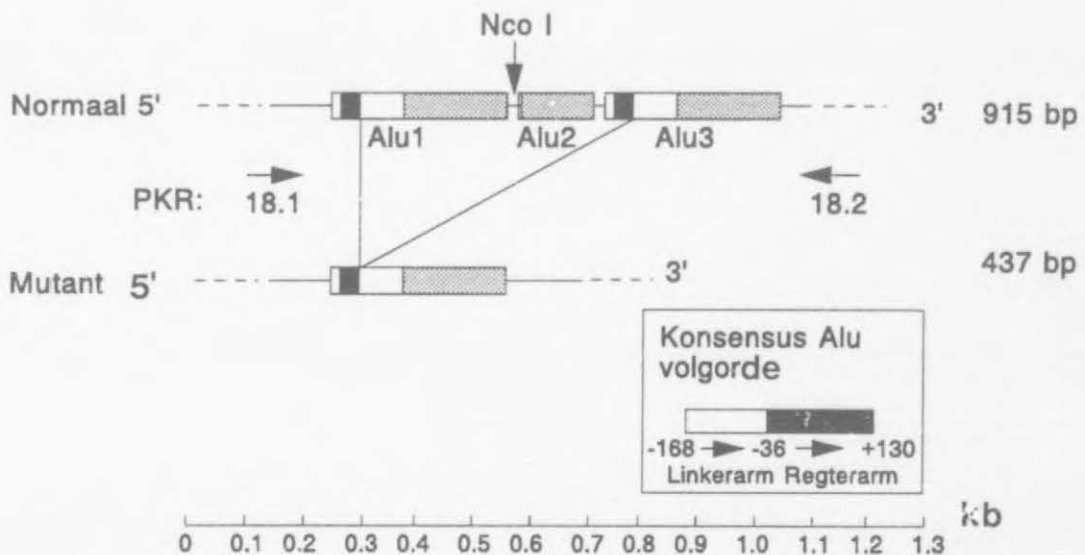


FIG. 3-N. ORIËNTASIE VAN DIE *ALU* HERHALENDE VOLGORDES IN DIE 3'-ONGETRANSLIEERDE STREEK VAN EKSON 18 IN DIE NORMALE LDL RESEPTOR GEEN EN DIE OOREENSTEMMENDE STREEK VAN DIE DELEISIE-DRAENDE GEEN VAN FH 231. DIE STRUKTUUR VAN 'N KONSENSUS *ALU* HERHALING (DEININGER ET AL., 1981) MET LINKERKANTSE ARM EN REGTERKANTSE ARM WORD IN DIE RAAMPIE AANGETOON.

Uit die DNA volgorde data van ekson 18 van die LDL reseptor geen is dit duidelik dat die deleisie sy ontstaan kon gehad het in 'n rekombinasie tussen die twee identiese nukleotiedvolgordes in die linkerarms van die twee *Alu* volgordes (*Alu* 1 en *Alu* 3) in die LDL reseptor geen wat betrokke is.

Om die verhouding tussen die 478 bp deleisie in ekson 18 van die LDL reseptor geen en FH te ondersoek, is die segregasie van verhoogde

cholesterol en die abnormale LDL reseptor geen fragment in die familie van die indekspasiënt gevolg. Fig. 3-O toon die resultate verkry nadat die PCR-produkte van die indekspasiënt, FH 231 (die heterosigotiese moeder), haar dogter, haar suster en lg. se dogter op 'n 2% agarose gel geëlektroforeer is. FH 231 met 'n totale cholesterolvlak van 9.0 mmol/L, is in baan I-2 gelaai, terwyl haar dogter, wat 'n normale totale cholesterolvlak van 5.38 mmol/L het, in baan II-2 gelaai is. Hierdie resultate toon dat die normocholesterolemiese dogter nie die mutasie oorgeërf het nie en dus segregeer die FH fenotipe saam met die deleisie. FH 231 se suster is in baan I-1 gelaai en lg. se dogter in baan II-1. Die suster van die indekspasiënt het 'n totale cholesterolvlak van 8.29 mmol/L gehad, terwyl die suster se dogter se totale cholesterolvlak 7.09 mmol/L was. Die verhoogde cholesterolvlak in beide hierdie individue word veroorsaak deur sekondêre faktore.

'n Totaal van 50 Kleurlinge met FH is verder gesif vir die deleisie wat in FH 231 geïdentifiseer is. Slegs een FH heterosigoot, FH 1333, met die FH-1 mutasie het 'n deleisie getoon (Fig. 3-O). Hierdie pasiënt het 'n totale cholesterolvlak van 8.2 mmol/L getoon, terwyl die LDL-C vlak 6.6 mmol/L was. Bogenoemde impliseer dat hierdie slegs 'n polimorfisme is wat 'n lae voorkoms in die Kleuringpopulasie het. Die deleisie is nie opgespoor in die 21 kontroles wat in die RFLP studie gebruik is nie.

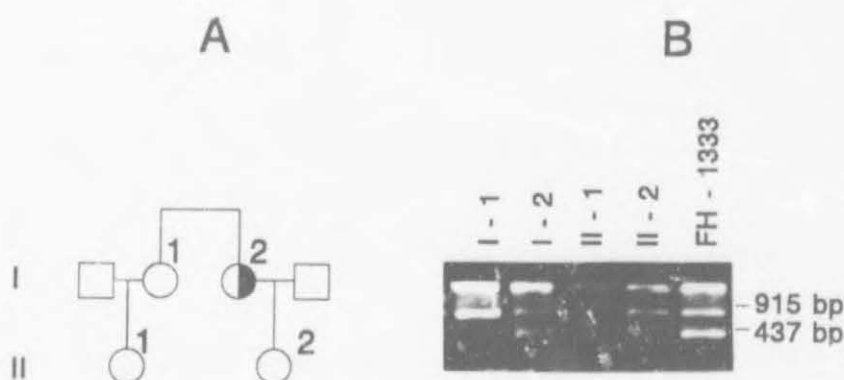


FIG. 3-O. ETHIDIUMBROMIED GEKLEURDE AGAROSE GEL (2%) OM DIE SEGREGASIE VAN DIE 478 BP DELESIE IN EKSON 15 VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN EN FH IN DIE FAMILIE VAN FH 231, AAN TE TOON. DIE INDEKSPASIENT (LAAN I-2), FH 231, HET DIE NORMALE 915 BP BAND, ASOOK 'N ABNORMALE 478 BP BAND GETOON. DIE DOGTER VAN DIE INDEKSPASIENT (LAAN II-2) HET ALLEENLIK DIE NORMALE 915 BP BAND. DIE INDEKSPASIENT SE SUSTER (LAAN I-1) EN LG. SE DOGTER (LAAN II-1) HET OOK BEIDE SLEGS DIE NORMALE 915 BP BAND. FH 1333 (LAAN 5), 'N FH HETEROSIGOOT MET DIE FH-1 MUTASIE, TOON 'N SOORTGELYKE DELESIE AS FH 231.

3.4. *TA-herhalende volgorde polimorfisme studie*

TA-herhalende-volgorde-polimorfismes in ekson 18 ontstaan deurdat die aantal dinukleotiedvolgordes tussen individue verskil. Hierdie verskille het tot gevolg dat fragmente met verskillende lengtes d.m.v. PKR geproduseer word wat dan Mendelies oorgeërf word.

Tydens hierdie studie is 15 FH heterosigote en 15 kontrole individue suksesvol vir die TA-dinukleotied-herhalende-volgorde in ekson 18 van die LDL reseptor geen ondersoek (Zuliani & Hobbs, 1990).

Vier verskillende allele is waargeneem na PKR-vermeerdering en gel-analise van die TA-herhalende-volgorde in 15 FH heterosigote (Fig. 3-P). Die vier

verskillende allele word as A1, A2, A3 en A4 aangedui (A4 die kleinste) en wissel in grootte van 106 bp (A4) tot by 112 bp (A1). Die allele verskil met 2 nukleotiede van mekaar, m.a.w. een TA-dinukleotied eenheid.

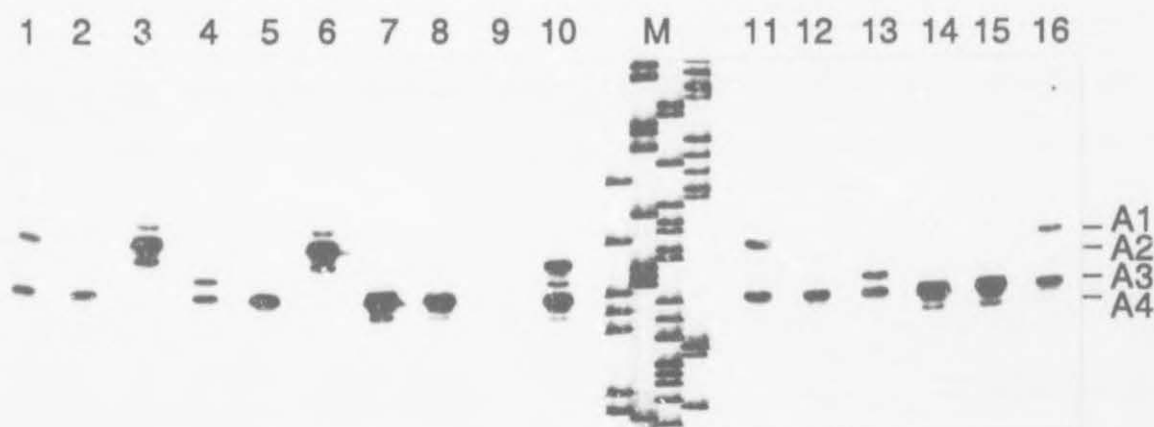


FIG. 3-P. OUTORADIOGRAM MET DIE RESULTATE VAN DIE GENOTIPERING VAN 15 FH HETEROSIGOTE VIR ALLELE BY DIE TA-HERHALENDE-VOLGORDE LOKUS IN EKSON 18. DNA IS RADIO-AKTIEF GEAMPLIFISEER NA RADIO-AKTIEWE MERKING VAN EEN VAN DIE PKR VOORVOERDERS MET [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP. FRAGMENTE MET GROOTTES VAN 106 (A4), 108 (A3), 110 (A2) EN 112 (A1) BP IS WAARGENEEM. DIE VOLGORDELEER VAN BAKTERIOFAAG M13 (M) IS AS GROOTTESTANDAARD GEBRUIK.

Drie verskillende allele is in die kontrole populasie waargeneem, nl. 106 (A4), 108 (A3), en 112 (A1) bp (Fig. 3-Q). Alleel A2 (110 bp) is nie in die kontrole populasie waargeneem nie.

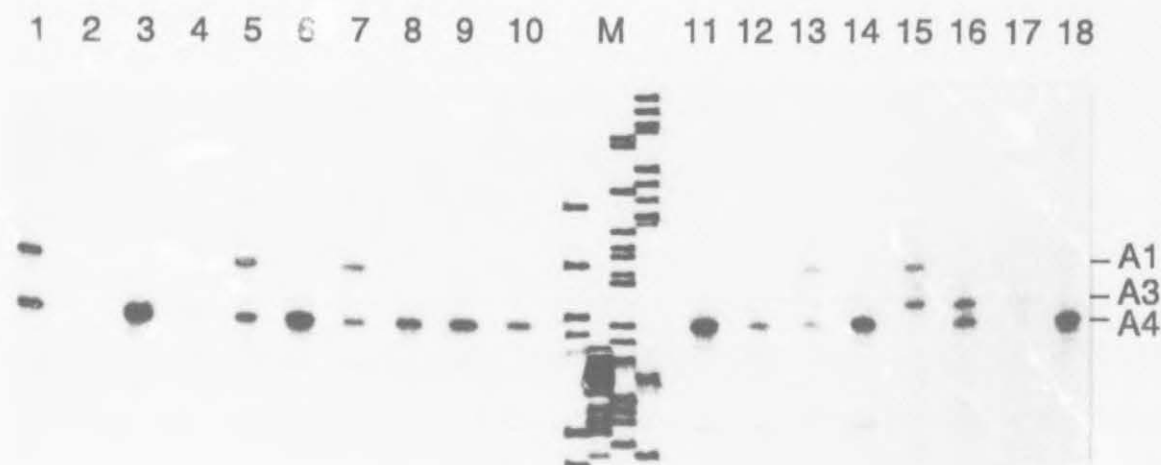


FIG. 3-Q. OUTORADIOGRAM MET DIE RESULTATE VAN DIE GENOTIPERING VAN 15 KONTROLES VIR ALLELE BY DIE TA-HERHALENDE-VOLGORDE LOKUS IN EKSON 18. DNA IS RADIO-AKTIEF GEAMPLIFISEER NA RADIO-AKTIEWE MERKING VAN EEN VAN DIE PKR VOORVOERDERS MET $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP. FRAGMENTE VAN 106 (A4), 108 (A3) EN 112 (A1) BP IS WAARGENEEM. DIE VOLGORDELEER VAN BAKTERIOFAAG M13 IS AS GROOTTESTANDAARD GEBRUIK (M).

Die waargenome verspreiding van genotipes in die FH en kontrole populasies word in tabel 3-J aangegee.

TABEL 3-J. VERGELYKING VAN DIE GENOTIPE VERSPREIDING EN GENOTIPE FREKWENSIES VAN DIE TA-HERHALENDE-DINUKLEOTIED-POLIMORFISME VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN IN DIE FH EN KONTROLE POPULASIES.

Genotipe	FH Chromosome (n=15)		Kontrole chromosome (n=15)	
	nr.	%	nr.	%
106/106 (A4/A4):	7	47	9	60
106/108 (A4/A3):	2	13.3	1	6.6
106/110 (A4/A2):	1	6.6	0	0
106/112 (A4/A1):	3	20	4	27
108/112 (A3/A1):	0	0	1	6.6
112/112 (A1/A1):	2	13.3	0	0

Die alleelfrekwensies, heterosigositeit en PII waardes vir die TA-herhalings-polimorfisme is bereken soos reeds beskryf in die RFLP studie. Die heterosigositeit van die TA-herhalende-polimorfisme was 40% in beide die FH en die kontrole populasies, wat elk uit 15 individue bestaan het. Die polimorfiese informasie inhoud (PII) van hierdie dinukleotiedherhaling is 0.443 in die FH populasie en 0.36 in die kontrole populasie. Die alleelfrekwensies, groottes van die PKR-produkte en aantal TA-herhalings word saam met die heterosigositeit (H) en PII waardes in tabel 3-K opgesom vir beide die FH en kontrole populasies.

TABEL 3-K. ALLEELFREKWENSIES, HETEROSIGOSITEIT EN PII WAARDES SOOS BEPAAL VIR DIE FH EN KONTROLE (K) POPULASIES VIR DIE TA-HERHALENDE-DINUKLEOTIED-POLIMORFISME IN EKSON 18 VAN DIE LDL RESEPTOR GEEN.

Alleel	PKR-produk grootte (bp)	Aantal TA herhalings	% Hetero- sigositeit	PII	Alleelfrekwensie
FH populasie			40	0.44	
A1	112	10			0.23
A2	110	9			0.03
A3	108	8			0.07
A4	106	7			0.7
Kontrole populasie			40	0.36	
A1	112	10			0.17
A2	110	9			0
A3	108	8			0.07
A4	106	7			0.77

Tabel 3-K toon die informatiwiteit van die polimorfiese TA-herhalende lokus in ekson 18 van die LDL reseptor geen aan. Allele A1 en A2 kom teen hoër

frekwensies voor in die FH populasie as in die kontrole populasie, terwyl die frekwensie van die A4 alleel laer is as in eg. groep.

Na die uitvoer van die χ^2 -toets, is gevind dat beide die FH en die kontrole populasies in Hardy-Weinberg ewililibrium is (FH: $\chi^2 = 3.68$, $p < 0.3$; kontroles: $\chi^2 = 2.3$, $p < 0.7$). Die vryheidsgrade was drie. Toe die alleelfrekwensies van die kontrole populasie gebruik is om die verwagte getalle in die FH populasie te bereken, is 'n statisties beduidende waarde van $\chi^2_{(3)} = 8.86$ gekry ($P < 0.05$). Dit dui moontlik daarop dat die A1 alleel 'n beduidende verhoging in die FH populasie ondergaan het, soos weerspieël word in tabel 3-J. Hierdie resultate is egter moeilik om te interpreteer, aangesien die getalle wat geanaliseer is in die FH en kontrole populasies baie klein is.

4. BESPREKING EN TOEKOMSVERWAGTINGE

4.1. *Bespreking*

Die Kleurling- en Engelssprekende populasies van Suid-Afrika deel voorouers met die Blanke Afrikaanssprekende populasie, aangesien 'n baie hoë persentasie van hierdie individue afstam van minder as 2000 setlaars wat teen die 17de en 18de eeu aan die Kaap gearriveer het (Theal, 1922; Botha & Beighton, 1983). Hierdie beperkte geenpoel of stigtergroep is al honderdvoudig uitgebrei sonder veel verdunning van buite. FH is min of meer vyf maal meer algemeen in die Afrikanerpopulasie as in die meeste ander bestudeerde populasies en 'n stigtergeeneffek is voorgestel as verduideliking (Seftel et al., 1980). In die Afrikanerpopulasie is daar drie stigtergeenmutasies wat FH veroorsaak in omtrent 90% van geaffekteerde individue (Kotze et al., 1991). Frekwensie-bepaling van die drie LDL reseptor geen mutasies in die Afrikaner FH pasiënte het getoon dat die FH-Afrikaner-1 (Asp₂₀₆→Glu, FH-1) en FH-Afrikaner-3 (Asp₁₅₄→Asn, FH-3) mutasies onderskeidelik teenwoordig is in ongeveer 60% en 10% van FH heterosigote, terwyl die FH-Afrikaner-2 (Val₄₀₈→Met, FH-2) mutasie in ekson 9 teenwoordig is in 20% van FH heterosigote (Kotze et al., 1991; 1992). 'n Soorigelyke studie (Van Roggen et al., 1991) het bg. data ondersteun.

Aangesien variasie in die kliniese uitdrukking van heterosigotiese FH die diagnose en genetiese raadgewing van pasiënte kompliseer, is die direkte opsporing van siekte-verwante LDL reseptor geen mutasies voordelig vir

akkurate diagnose van FH. Die waarde van 'n molekulêre diagnose van FH is onlangs aangetoon in die Afrikanerpopulasie van Suid-Afrika, waar ongeveer 90% van FH pasiënte akkuraat gediagnoseer kan word deur analise van die FH-1, FH-2, en FH-3 mutasies (Kotze et al., 1994). In 'n poging om die presimptomatiese diagnose van FH in die Kleurlingpopulasie te verbeter, is die individue in hierdie studie vir FH-verwante mutasies gesif.

4.1.1. Mutasie-analise van PKR-produkte

In hierdie studie is besluit om hoofsaaklik ekson 4 aan mutasie-analise te onderwerp, aangesien hierdie ekson, wat 382 bp lank is, 'n mutasieryke streek van die LDL reseptor geen uitmaak. Teen 1992 was daar reeds 24 mutasies gerapporteer (Hobbs et al., 1992) en sedertdien is daar 4 nuwe FH-verwante ekson 4 mutasies in ons laboratorium geïdentifiseer [Theart et al., in druk; Kotze et al., in druk (2); Peeters et al., ingestuur].

Die mutasie-geneigtheid van ekson 4 kan verklaar word in die lig van die feit dat ekson 4 'n hoër persentasie van CpG dinukleotiede besit as enige ander koderende gedeelte van die LDL reseptor geen. In ekson 4 kom daar 26 CpG dinukleotiede voor, ongeveer 1 uit elke 15 basisse, in vergelyking met die 1 uit elke 22 basisse in die res van die koderende gedeelte van die LDL reseptor geen (Gudnason et al., 1993). CpG volgordes is geneig tot deaminase van sitosien na timidien en staan bekend as mutasie-geneigde setels (Cooper & Youssoufian, 1988).

'n Verdere belangrike rede vir die keuse van ekson 4 vir mutasie-analise is die feit dat ekson 4 vir drie van die sewe sisteïenryke tandemherhalings (herhaling 3, 4, en 5) in die ligandbindende gebied van die LDL reseptor kodeer (Hobbs et al., 1990). Mutasies in ekson 4 kan lei tot die foutiewe vervoer van die reseptorproteïen na die seloppervlak (klas 2 mutasies: transport-defektiewe mutasies). 'n Sterk konsentring van klas 2 mutasies kom voor in herhaling 5 (Hobbs et al., 1992). Herhaling 5 is uniek onder die sewe herhalings in die ligandbindende gebied, aangesien sy struktuur benodig word vir die binding van beide van die LDL reseptor se ligande. Ekson 4 mutasies kan dus ook bindings-defektiewe mutasies veroorsaak (klas 3 mutasies)(Hobbs et al., 1990).

4.1.1.1.Sifting van die Kleurlingpopulasie vir die FH-Afrikaner-1, -2 en -3 mutasies deur gebruik te maak van die amplifikasie-inhiberende-mutasie-sisteem (AIMS)

Die sifting van die Kleurlingpopulasie vir die FH-Afrikaner mutasies is uitgevoer om te bepaal wat die voorkoms van die mutasies in die Kleurlingpopulasie is. In totaal is 31 FH heterosigotiese en 39 hiperlipidemiese Kleurlinge (TBH) gesif vir die FH-1, -2 en -3 mutasies deur middel van AIMS-PKR. Die FH-1 mutasie was teenwoordig in vier FH heterosigote (12.9%), by wie die totale cholesterolvlakke gewissel het tussen 7.7 en 11.6 mmol/L (gem. = 10.2 mmol/L). Die FH-2 mutasie was ook

teenwoordig in vier pasiënte (12.9%), met totale cholesterolwaardes van pasiënte wat gewissel het tussen 8.84 en 13.1 mmol/L (gem. = 11.2 mmol/L). Die fenotipiese uitdrukking van die FH-1 en FH-2 mutasies volg dieselfde patroon as wat in die Afrikaners aangetoon is (Kotze et al., 1993). Die FH-3 mutasie is nie waargeneem nie. Die 39 hiperlipidemiese Kleurlinge het nie die FH-Afrikaner mutasies getoon nie. In 'n totaal van 31 Kleurlinge het die DNA diagnose met AIMS-PKR dus die kliniese diagnose van heterosigotiese FH bevestig in 26% van die individue getoets.

Genotipering van die Kleurling FH-1 heterosigote het aangetoon dat die mutasie in al vier families op dieselfde vier-polimorfisme haplotipe voorkom. Dit is sonder twyfel in drie familieledes van een familie bepaal. Hierdie haplotipe was identies aan die haplotipe vir die FH-1 mutasie wat in die Afrikaners gerapporteer is (Leitersdorf et al., 1989; Kotze et al., 1990).

Die FH-1 en FH-Maine mutasies besit dieselfde basispaarsubstitusie (GAC-GAG) in kodon 206 aan die 3'-kant van ekson 4 (Hobbs et al., 1990). Haplotipe analise uitgevoer in die FH-1 en FH-Maine pasiënte (Hobbs et al., 1990) het 'n identiese restriksie-endonuklease patroon by 9 van die 10 RFLP setels getoon met slegs een setel, die mees 3' geleë setel, *Apa* L1, wat verskil het. Dus, het hierdie twee individue, 'n Afrikaner van Suid-Afrika en 'n Amerikaner van Britse afkoms, heel moontlik dieselfde voorouer gehad. 'n Redelike onlangse oorkruising by die 3'-kant van die geen kan die verskil by die enkele RFLP setel (*Apa* L1) verklaar. Aangesien omtrent 5% van die oorspronklike setlaars in Suid-Afrika Brits was, kon aangeneem word dat

hierdie mutasie sy oorsprong het in Brittanje. Gudnason het in 1993 gerapporteer dat hy die FH-1 mutasie in drie van sy pasiënte opgespoor het, nl. in twee pasiënte wat in Engeland woonagtig was vir verskeie generasies, en 'n pasiënt van Suid-Afrika wat nie 'n Afrikaneroorsprong gehad het nie. Vir al drie individue kon uit die genotipes afgelei word dat die Asp₂₀₆→Glu mutasie op dieselfde ses-polimorfisme-haplotipe voorkom. Hierdie haplotipe was identies aan die haplotipe gerapporteer vir die mutasie in die Afrikanerpopulasie. Defesche (1993) het ook gerapporteer dat die FH-1 mutasie op die Afrikanerhaplotipe in FH pasiënte van Engelse oorsprong in Nederland opgespoor is. Dit blyk dus dat die FH-1 mutasie óf vanaf die Afrikanerpopulasie na die Kleurlingpopulasie oorgedra is, óf dat die Kleurlingpopulasie die mutasie direk vanaf Britse voorvaders kon oorgeërf het.

Die FH-1 mutasie is 'n klas 2B mutasie wat kodeer vir proteïene waarvan die vervoer gedeeltelik geblokkeer word tussen die endoplasmiese retikulum en die Golgi apparaat (Hobbs et al., 1990, 1992; Leitersdorf et al., 1989). Die COOH terminale punt van elkeen van die sewe herhalings in die ligandbindende gebied besit 'n negatief gelaaide Asp-X-Ser-Asp-Glu konsensusvolgorde wat op die oppervlakte van die reseptorproteïen geleë is. Hierdie negatiefgelaaide konsensusvolgorde bind blykbaar aan die positiefgelaaide lisien- en arginienresidue in die twee ligande van die LDL reseptor, nl. apo B en apo E (Yamamoto et al., 1984). Die FH-1 mutasie vervang een van hierdie hoogs gekonserveerde aminosure in die

konsensusvolgorde, nl. aspartienuur, met glutamienuur. Glutamienuur se syketting verskil net met 'n enkele CH₂ van dié van aspartienuur. Op dié manier word die transport-defektiewe fenotipe wat FH in individue met die FH-1 mutasie veroorsaak, geskep (Leitersdorf et al., 1989). Dit is aanduidend van hoe sensitief die meganismes betrokke by proteïenvouing is vir klein veranderings. Die FH-1 mutasie gee aanleiding tot 'n relatief gematigde vorm van FH (Kotze et al., 1993).

Haplotype-analise in normocholesterolemiese en FH Afrikanerpopulasies het getoon dat die FH-2 mutasie met 'n enkele 10-RFLP-polimorfismearangskikking in Afrikaners geassosieer is (Kotze et al., 1989a). In pasiënte van Nederlandse afkoms is die FH-2 mutasie in 1.6% van die individue waargeneem (Defesche, 1993). Van die 16 FH-2 heterosigote wat in die Nederlandse pasiënte geïdentifiseer is, het 7 dieselfde LDL reseptor geen haplotype getoon as wat in die Afrikaner pasiënte waargeneem is. Die oorblywende 9 het almal dieselfde FH-2 geassosieerde haplotype getoon, wat gedeeltelik identies was aan die haplotype in Afrikaners. Hierdie haplotype kon moontlik vanaf 'n enkele rekombinasie-gebeurtenis sy ontstaan gehad het. Genealogiese en haplotype studies (J.C. Defesche, persoonlike kommunikasie) ondersteun die hipotese dat die FH-2 mutasie in Nederland sy oorsprong gehad het en na Suid-Afrika oorgedra is deur 'n vroeë Nederlandse setlaar in die 17de eeu.

Om vas te stel of die FH-2 mutasie wat ook in die Kleurlinge opgespoor is, dieselfde mutante alleel van 'n gemeenskaplike voorouer oorgeërf het en of die mutasie vir 'n tweede keer onafhanklik ontstaan het, is haplotipe analise uitgevoer deur 4 polimorfiese setels (Kotze et al., 1986, 1987b; Hobbs et al., 1987; Jensen et al., 1994) in die LDL reseptor geen te analiseer. 'n Siekte-geassosieerde haplotipe wat daarop dui dat die chromosomale agtergrond vir die FH-2 mutasie by die Kleurlinge verskil van dié van die Afrikaners en die Nederlanders, is in die vier Kleurlinge met die FH-2 mutasie waargeneem. Die Afrikanerhaplotipe soos saamgestel uit die vier setels wat bestudeer is, was as volg: *Sma* I-, *Stu* I+, *Ava* II-, *Nco* I-. Die Kleurlinghaplotipe, *Sma* I+, *Stu* I+, *Ava* II-, *Nco* I+ het dus heeltemal verskil van die Afrikanerhaplotipe wat betref die *Sma* I RFLP aan die 5'-kant en die *Nco* I RFLP aan die 3'-kant van die FH-2 mutasie in ekson 9. Die resultate dui daarop dat die FH-2 mutasie in die Kleurlinge onafhanklik van die FH-2 mutasie in die Afrikaners ontstaan het, aangesien die haplotipe verskil het aan beide kante van die FH-2 mutasie in ekson 9. Onafhanklike mutasie-gebeure in ekson 9 het dus tot gevolg gehad dat die FH-2 mutasie in twee verskillende Suid-Afrikaanse gemeenskappe ontstaan het. Pogings om die oorspronklike etniese agtergrond van die FH-2 heterosigote te bestudeer om vas te stel waar die pasiënte inpas in die Kleurlingpatrone wat in Suid-Afrika bestaan, was onsuksesvol. Die *Sma* I RFLP is 'n uitstekende LDL reseptor geen merker wat vir haplotipe studies gebruik kan word (Jensen et al., 1994). Die frekwensie van hierdie merker is hoog in beide die FH en die kontrole

Kleurlingpopulasies (sien afdeling 3.3). Uit die resultate kan bewyse dus aangevoer word teen die moontlikheid dat die basispaarverandering wat die *Sma* I setel in die Kleurlinge geskep het, op 'n ou FH-2 mutasie-geassosieerde haplotipe ontstaan het wat 'n enkele rekombinsie ondergaan het.

Die verskynsel van herhaalde mutasies wat in dieselfde land ontstaan het, kan verduidelik word deur die waarneming dat die enkele basissubstitusie in ekson 9 'n gemetileerde CpG dinukleotied behels (Cooper & Youssoufian, 1988). Ander mutasies wat onafhanklik ontstaan het in ekson 4 by CpG dinukleotiede, in verskillende populasies, sluit onder andere in die FH-Frans-Kanadese-3 mutasie in kodon 207 (GAG-AAG) van ekson 4 (Leitersdorf et al., 1990) en die FH-Puerto Rico mutasie (Hobbs et al., 1992). Beide mutasies is voorbeelde van transisies by mutasie-geneigde CpG dinukleotiede.

Die FH-2 mutasie is 'n klas 5 mutasie wat beteken dat die LDL reseptore nie kan hersirkuleer na die seloppervlakte nie (hersirkulerings-defektiewe mutasie). Die dissosiasie van die reseptor en die ligand word gemedieer deur die EGF homologie gebied, 'n essensiële gebeurtenis in die hersirkulering van die reseptore (Davis et al., 1987b). In die geval van die FH-2 mutasie bereik die proteïen die seloppervlakte, maar word vinnig gedegradeer (Leitersdorf et al., 1989). Die FH-2 mutasie veroorsaak aansienlike verhoogde cholesterolvlakke en kan dood op 'n redelike jong ouderdom tot gevolg hê.

Dit is om hierdie rede dat dit baie belangrik is om die FH-2 pasiënte presimptomaties op te spoor (Defesche, 1993 ; Kotze et al., 1992; 1993).

Die AIMS-PKR tegniek het 'n vinnige en koste-effektiewe metode daargestel om vir die FH-1, -2 en -3 mutasies te sif. Die spesifisiteit van die reaksie was grootliks afhanklik van die temperatuurveranderings gedurende PCR (Kotze et al., ongepubliseerde data). Die 330 bp interne kontrole fragment van ekson 4 is by voorkeur geamplifiseer by oligonukleotied-vashegtingstemperature van tussen 60 en 68°C. Dit het daartoe gelei dat die 285 (FH-1 mutasie-spesifiek) en/of 257 (FH-3 mutasie-spesifiek) bp fragmente swak of glad nie geamplifiseer het nie. Hierdie probleem is grootliks opgelos deur die spesifieke temperatuur waarby die voorvoerders aan die DNA bind, te verminder na 55°C na die eerste 10 siklusse. Byvoeging van gliserol in die PCR (Lu & Negre, 1993) is gevind om die amplifikasie van die 285 bp fragment verder te verbeter, terwyl byvoeging van 'n oormaat van die AIMS-3 voorvoerder die opbrengs van die 257 bp fragment verbeter het. Amplifikasie van die 100 bp fragment, spesifiek vir die FH-2 mutasie in ekson 9, het onafhanklik van die bogenoemde reaksies plaasgevind, en die spesifisiteit van die reaksie is verhoog deur 'n bykomende misparende nukleotied naby die 3'-kant van die AIMS-2 voorvoerder te inkorporeer. Dit is gedoen om vals positiewe resultate te vermy. Tetrametielammonium-chloried (Me_4NCl) (Ugozzoli & Wallace, 1992) is ook in die AIMS-PKR gebruik, aangesien dit die smeltpunt van A-T teenoor G-C basispare, wat by voorkeur plaasvind, elimineer. Hierdie verbinding

verminder ook die teenwoordigheid van nie-spesifieke fragmente weens die verkeerde binding van voorvoeders.

'n Verdere voordeel van die AIMS-PKR siftingsmetode is dat pasiënte wat normaal was vir die FH-1, FH-2 en FH-3 mutasies verder gesif kon word vir ander mutasies in ekson 4, deur die interne kontrole produkte van 330 bp wat verkry word in die reaksie, te onderwerp aan heterodupleks- en ESKP-analise.

4.1.1.2. Sifting vir bekende en onbekende mutasies in ekson 4 van die LDL reseptor geen deur heterodupleks-analise

'n Totaal van 23 FH heterosigote en 156 hiperlipidemiese individue se 330 bp interne kontrole fragmente is aan heterodupleks-analise onderwerp. Na heterodupleks-analise en DNA volgorde bepaling van die PCR-produkte van individue wat heterodupleksbande getoon het, is gevind dat een FH heterosigoot 'n 3 bp delesie (Gly₁₉₇→del, FH-Lithuania) het (Meiner et al., 1991). Hierdie pasiënt het 'n totale cholesterolvlak van 14.6 mmol/L gehad, wat die hoogste was van al die pasiënte in wie daar mutasies opgespoor is. Die mutasie kom dus in die FH populasie voor teen 'n persentasie van 4.3%. Hierdie sg. FH-Lithuania mutasie is ook in twee hiperlipidemiese individue uit 'n totaal van 156 (1.28%) waargeneem. Uit die resultate is dit duidelik dat die voorkoms van die mutasie hoër is in die FH heterosigote.

'n Studie deur Seftel et al. (1989) het getoon dat daar 'n hoë voorkoms van FH in Suid-Afrikaanse Jode is. Die FH-Lithuania mutasie kom voor in die meerderheid van FH gevalle in Suid-Afrikaanse Jode (Meiner et al., 1991). Meiner et al. het gevind dat die mutasie voorkom in 35.2% van die Ashkenazi Jode wat hy bestudeer het. Uit genealogiese analise is 'n wêreldwye verspreiding van die FH-Lithuania mutasie aangetoon, in kontras met die ander LDL reseptor geen stigtermutasies wat al gerapporteer is en wat beperk is tot spesifieke geografiese verspreidings. 'n Stigtergeeneffek by die Ashkenazi Jode het dus onwaarskynlik gelyk.

Die lae persentasie van die FH-Lithuania mutasie in die FH heterosigotiese en hiperlipidemiese Kleurlinge wat bestudeer is, maak dit moeilik om te voorspel of die resultate verteenwoordigend is van wat verwag kan word in ander FH Kleurling pasiënte in Suid-Afrika. Dieselfde verskynsel van lae frekwensies van individuele deleesies is in 'n groep van 200 FH pasiënte deur Sun et al. (1992) in Engeland waargeneem.

Die genotipes van FH 792, 2631 en 1279, is verenigbaar met die haplotipe wat Meiner et al. (1991) gevind het in assosiasie met die 3 bp deleisie in Jode, nl. *Stu* I+, *Ava* II+, en *Nco* I-. 'n Identiese mutasie, bekend as FH Piscataway, is gerapporteer onder die sg. Dallas versameling van FH homosigote (Hobbs et al., 1990). Na karakterisering op sellulêre vlak, is die mutasie geklassifiseer as 'n klas 2 mutasie (transport-defektiewe mutasie) (Hobbs et al., 1990). Hierdie mutasie lei heel moontlik tot 'n verkeerde vouing van die bindingsgebied van die LDL reseptor a.g.v. die abnormale spasiering tussen

gekonserveerde sisteïenresidue. Op hierdie manier kan 'n blokkering van vervoer van reseptor-voorvoerdermolekules na die seloppervlakte plaasvind.

Veelvoudige meganismes is al voorgestel vir die ontstaan van delesies kleiner as 20 bp (Krawczak & Cooper, 1991). In 93% van die gene met sulke delesies wat bestudeer is, toon die DNA-volgorde wat betrokke is direkte herhalings van 2 tot 8 bp wat óf die delesie-basisse insluit óf die basisse oorvleuel. In die geval van die 3 bp-delesie in die LDL reseptor geen (FH-Lithuania), is daar 'n herhalingsvolgorde van TGG-TGG, met die interne GGT wat verlore gegaan het.

In hierdie studie is bevestig dat 'n 10% poli-akriëlamiedgel met 'n 1% kruiskoppeling en 15% ureum blyk om optimale toestande te wees vir die opspoor van puntmutasies d.m.v. heterodupleks-analise (Peeters & Kotze, in druk). Prior et al. (1993) het aangetoon dat die byvoeging van 15% ureum in die geloplossing die effektiwiteit van opsporing van mutasies met heterodupleks-analise verhoog. Hierdie analise is verder geweldig koste-effektief, aangesien daar tot drie keer opeenvolgend in dieselfde lane gelaai kan word. In 'n onlangse studie [Kotze et al., in druk(1)] is gevind dat heterodupleks-analise sensitief genoeg is om beide die enkelbasis-paarveranderings in die apo B geen wat FDB veroorsaak (Innerarity et al., 1987; Soria et al., 1989; Pullinger et al., 1993), op te spoor. Hierdie benadering kan baie waardevol wees vir differensiële diagnoses van FH en FDB, waar soortgelyke kliniese kenmerke gedeel word. Hierdie metode is

ook gebruik om FDB uit te skakel in al die Kleurlinge wat in hierdie studie gesif is vir mutasies in die LDL reseptor geen.

Die heterodupleksmetode was sensitief genoeg om die FH-1 mutasie op te spoor, aangesien 5 individue uit die groep van 66 individue wat vir die eerste keer aan mutasie-analise onderwerp is, die FH-1 mutasie getoon het.

*4.1.1.3. Sifting van ekson 4 van die LDL reseptor geen vir
onbekende mutasies met die enkelstring-konformasie-
polimorfisme-metode (ESKP)*

ESKP migrasie-patrone is waargeneem in een FH heterosigoot (FH 333) (4.5%) uit 22 FH heterosigote waarvan PKR-produkte (3'-kant van ekson 4) aan ESKP-analise onderwerp is.

Die nuwe mutasie, nl. FH-Tygerberg, behels 'n puntmutasie by nukleotied 671 in ekson 4 van die LDL reseptor geen. Die nukleotiedverandering lei tot die vervanging van die aminosuur aspartiensuur met die aminosuur alanien. Die mutasie het nie plaasgevind by 'n CpG dinukleotied nie. Aangesien die mutasie 'n snyplek skep vir die *Hae* III restriksie-endonuklease, kan daar in die toekoms sonder moeite vir hierdie mutasie gesif word.

Die FH-Tygerberg mutasie het plaasgevind in die hoogs gekonserveerde apo E/apo B herhaling 5 van die ligandbindingsgebied. Hierdie gebied is soos reeds bespreek, uniek onder die sewe ligandbindende herhalings deurdat die struktuur daarvan benodig word vir die binding van beide die reseptor se

ligande. Die nuwe mutasie kan dus verwag word om 'n klas 2 mutasie (transport-defektiewe mutasie) te wees, heel moontlik deurdat dit 'n negatiewe invloed het op die vorming van disulfiedbindings. Op dié manier kan die korrekte vouing van die reseptorproteïen gedurende sintese in die endoplasmiese retikulum nie plaasvind nie (Hobbs et al., 1992).

Die familie van FH 333 kon ongelukkig nie opgespoor word nie en dus kon segregasie studies, om te kyk of die mutasie saam met die FH fenotipe oorerf, nie uitgevoer word nie.

Die ESKP tegniek is gebruik om te sif vir onbekende mutasies in Kleurling FH pasiënte en hiperlipidemiese Kleurlinge wat reeds gesif is vir FH-Afrikaner mutasies en heterodupleksbande. Die FH-Tygerberg mutasie is nie waargeneem op die heterodupleksgels nie, maar wel op die ESKP gels. Dit is 'n aanduiding van die spesifieke toestande waaronder sekere mutasies gevisualiseer word. Bewyse hiervoor lê in die waarneming dat die mutasie sigbaar was met die insluiting van 10% en 7.5% ureum in die ESKP gels (of met die uitlating van ureum), maar toe 15% ureum ingesluit is, kon geen ESKP-patrone waargeneem word nie. Ureum wat teen 'n persentasie van 15% ingesluit word, en moontlik hoër, blyk om die vorming van die abnormale enkelstring se kenmerkende ESKP-patroon te onderdruk. Die temperatuur is ook 'n belangrike faktor, aangesien die ESKP gels wat teen 15°C, in teenstelling met 4-8°C geëlektroforeer is, geen ESKP-patrone by FH 333 (FH-Tygerberg mutasie) getoon het nie.

Die 1% kruiskoppeling is gekies vir beide heterodupleks- en ESKP-analise, aangesien dit bekend is dat komplementêre enkelstringe beter geskei word in gels met lae kruiskoppeling (Maxam & Gilbert, 1980). 'n Gel wat 'n lae % kruiskoppeling het is sagter, het groter poriegroottes en blyk om meer sensitief te wees vir opspoor van konformasies as gels met 'n hoër % kruiskoppeling (Hayashi, 1991). In die ESKP-analise word gels met 1 tot 2 % kruiskoppeling en 5 tot 6 % totale akrielamied algemeen gebruik (Mashiyama et al., 1990).

Op hierdie stadium is dit nog nie bekend waarom 'n aantal van vier individue op 'n 2.5 % kruiskoppeling gel vals ESKP-patrone getoon het nie. DNA volgorde bepaling van die PKR-produkte van hierdie FH pasiënte het bevestig dat die individue geen nukleotiedveranderinge in ekson 4 gehad het nie.

Dit is interessant om waar te neem dat die FH-1, FH-Tygerberg en FH-Lithuania mutasies naby geleë aan mekaar is in 'n besonder mutasie-ryke gedeelte van ekson 4, nl. vanaf kodon 197 tot by kodon 207 waar 10 van die 24 mutasies, beskryf tot en met 1992, in ekson 4 voorkom. Die ander 14 beskryfde mutasies in ekson 4 strek van kodon 88 tot by kodon 187.

Ses uit die 31 FH heterosigote het mutasies getoon wat in ekson 4 gelokaliseer kon word. Die oorblywende FH heterosigote (21 individue) se FH-geassoieerde mutasies is waarskynlik in die ander eksone of die promotorstreek van die LDL reseptor geen geleë.

In elke geval waar verskeie pasiënte met dieselfde mutasie in ekson 4 geïdentifiseer is, is 'n wye reeks van biochemiese en kliniese uitdrukking van die mutante allele waargeneem. Aangesien daar 'n klein aantal individue betrokke is, is dit moeilik om 'n duidelike verwantskap tussen 'n spesifieke mutasie en die biochemiese en kliniese parameters aan te toon. Dit sal egter moontlik word soos meer Kleurlingpasiënte met gedefinieerde mutasies in die LDL reseptor geen geïdentifiseer word. Al die effekte wat 'n puntmutasie op reseptorfunksionering het, kan nie gekoppel word aan die spesifieke gebied waarin die aminosuursubstitusie plaasgevind het nie, want sommige mutasies kan meer ekstensiewe skade aanrig, moontlik deur die interaksie tussen reseptorgebiede of tussen twee LDL reseptor molekules te beïnvloed (Soutar et al., 1989).

4.1.1.4. Sifting vir die 2.5 kb delesie van ekson 7-8 in die LDL reseptor geen

'n 2.5 kb delesie wat eksons 7 en 8 van die LDL reseptor geen insluit, is die eerste keer beskryf in twee FH homosigotiese Kleurlingpasiënte van gemengde oorsprong (Henderson et al., 1988). Tydens die haplotipe analise studie is slegs een haplotipe in assosiasie met die delesie gevind. Die twee homosigotiese pasiënte was homo-allelies vir al die RFLP's wat spesifiek geassosieer is met die 2.5 kb delesie (Henderson et al., 1988).

Die ongewone hoë frekwensie van die 2.5 kb delesie (FH-Cape Town-2) in FH pasiënte van die Nederlande, is volgens Defesche (1993) 'n aanduiding

dat die mutasie in die Nederlande ontstaan het en na ander dele van die wêreld soos Suid-Afrika oorgedra is deur vroeë Hollandse setlaars. Hierdie delesie was verder beperk tot sekere areas van die Nederlande, aangesien al die FH pasiënte met hierdie mutasie in die suidwestelike deel van die Nederlande gewoon het of hulle oorsprong daar gehad het.

Sifting van 10 FH heterosigote en 16 hiperlipidemiese Kleurlinge vir die 2.5 kb delesie d.m.v. die Southern-kladtegniek het geen individu met die mutasie aangetoon nie. Die rede waarom geen pasiënt met hierdie mutasie gevind is nie, kan waarskynlik toegeskryf word aan die klein studie-populasie en/of dat die frekwensie van die mutasie baie laag is in die Kleurlingpopulasie.

4.1.2. RFLP studie

Die RFLP studie is uitgevoer om te probeer vasstel of daar 'n ander algemene FH-verwante mutasie(s) teenwoordig is in die LDL reseptor geen wat nie aangetoon kan word met die mutasie-analise nie en waarvoor daar in toekomstige studies gesif moet word.

4.1.2.1. Die bepaling van RFLP genotipes en alleelfrekwensies in die FH en kontrole populasies

Restriksie-fragment-lengte-polimorfismes (RFLP's) ontstaan deur basis-paarveranderinge, insersies, delesies of herrangskikkings van DNA-fragmente wat verskille veroorsaak in die lengtes van spesifieke restriksie-endonuklease

fragmente. Hierdie veranderinge word waargeneem op agarose gels as bande wat op verskillende posisies migreer.

Nadat vier DNA polimorfismes in die mens LDL reseptor geen in 21 nie-verwante Kleurling kontroles en 17 nie-verwante FH heterosigote ondersoek is, en die alleelfrekwensies tussen die twee populasies vergelyk is, is gevind dat daar 'n statisties beduidende verhoging van die skaars alleel van die *Ava* II polimorfisme in die FH populasie is. Hierdie situasie was die omgekeerde van wat in die Afrikanerpopulasie waargeneem is waar daar 'n statistiese beduidende toename in die algemene alleel van die *Ava* II RFLP was in die FH groep (Kotze et al., 1989a). In die Kleurlingpopulasie kom die aanwesigheid van die snyplek dus meer dikwels voor in die FH groep as in die kontroles. Dit stel voor dat in die Kleurling FH populasie van hierdie studie 'n mutasie op 'n chromosoom met die skaarser alleel van die *Ava* II RFLP plaasgevind het wat 'n belangrike bydrae lewer tot mutasies wat FH veroorsaak in hierdie groep. Die verhoging in die skaars alleel van die *Ava* II polimorfisme kan dus moontlik toegeskryf word aan selektiewe voordeel, genetiese drywing geassosieer met die effekte van migrasie of die feit dat die studie-populasie klein was. Die moontlikheid bestaan egter ook dat meer as een mutasie met die skaars *Ava* II alleel geassosieer is. Hulle kan dus ook 'n algemene haplotipe deel.

Die vier RFLP's wat vir hierdie studie gekies is, kon nie gebruik word om te bepaal of hulle bruikbaar is as kosegregasie merkers vir die diagnose in families met FH nie, aangesien families nie beskikbaar was nie.

Die *Stu* I RFLP is die eerste keer gerapporteer in die Suid-Afrikaanse populasie (Kotze et al., 1986) waar die frekwensie van die algemene alleel gevind is om 0.92 te wees, wat nie baie verskil van die frekwensie wat in hierdie studie waargeneem is nie. Die *Nco* I RFLP is ook gerapporteer in die Suid-Afrikaanse blankes (Kotze et al., 1987b) waar die frekwensie van die algemene alleel 0.67 is in vergelyking met 0.8 in die Kleurlingpopulasie. Jensen et al. (1994) het 'n alleelfrekwensie van 0.565 gerapporteer vir die *Sma* I+ alleel, waar die frekwensie van hierdie alleel 0.79 in die Kleurlingpopulasie is. Hobbs et al. (1987) het die volgende alleelfrekwensies vir die *Ava* II polimorfisme gerapporteer, nl. 0.56 vir die algemene alleel en 0.44 vir die skaars alleel. Hierdie waarnemings verskil van dit wat in die Kleurlingpopulasie waargeneem is, wat betref die *Ava* II polimorfisme, aangesien die frekwensie van die skaars alleel 0.21 is en dié van die algemene alleel 0.79. Hierdie verskille in alleelfrekwensies tussen die verskillende populasies kan toegeskryf word aan verskille in genetiese agtergrond of aan die klein getalle wat geanaliseer is.

Koppelingsdisekwilibrium is waargeneem tussen die vier polimorfiese setels by die LDL reseptor lokus. Dit blyk uit die waarneming dat slegs 13 uit die moontlike 256 (4^4) genotipes in die FH en kontrole populasies waargeneem is. Hierdie bevinding is in lyn met RFLP studies in die LDL reseptor geen waar koppelingsdisekwilibrium ook oor kort afstande aangetoon is (Kotze et al., 1989a). Die vernaamste rede vir die koppelingsdisekwilibrium blyk te wees dat die polimorfiese setels naby aan mekaar gekoppel is.

4.1.2.2. Die berekening van heterosigositeit (H) en polimorfiese informasie inhoud (PII)

In hierdie studie is gevind dat die individuele RFLP setels redelik polimorfies is met heterosigositeite wat wissel tussen 29.4% en 41.2% vir die FH populasie (gemiddelde: 28%) en 38% en 43% vir die kontrole populasie (gemiddelde: 35.6%). Die *Stu* I setel het die laagste vlak van polimorfisme getoon in beide die FH en kontrole populasies. Die waargenome heterosigositeit vir die *Sma* I RFLP was 41.17% in die FH populasie en 42.8% in die kontrole populasie. Jensen et al. (1994) het 'n heterosigositeit van 41.9% en 53% gerapporteer vir onderskeidelik die FH en nie-FH individue en hierdie polimorfisme as hoogs informatief beskou in genetiese studies. In die Kleurlingpopulasie kan die *Sma* I setel dus op grond van heterosigositeitswaardes as die informatiefste van die vier setels beskou word. Die *Stu* I setel was die minste informatief. Die volgorde van informatiwiteit (hoog na laag) in die Kleurlingpopulasie, gebaseer op heterosigositeitswaardes is dus: *Sma* I, *Ava* II, *Nco* I en laastens *Stu* I.

Skolnick et al. (1984) het 'n opsomming gegee van die bekende polimorfismes en die verspreiding van PII waardes van die RFLP's aangetoon. Dit wil voorkom of die verspreiding van PII waardes van RFLP's dieselfde is as klassieke merkers se PII-verspreiding (Botstein et al., 1980).

Volgens Botstein et al. (1980) is PII waardes groter as 0.5 hoogs informatief, waardes tussen 0.5 en 0.25 redelik informatief en waardes kleiner as 0.25

min informatief in koppelingstudies. Die FH populasie het meer informatiwiteit getoon as die kontrole populasie met hoër PII waardes. Albei groepe se PII waardes was egter redelik informatief, behalwe in die geval van die *Stu I* polimorfisme waar 'n PII waarde van 0.16 in die kontrole populasie en 0.056 in die FH populasie waargeneem is. Die PII waardes van die *Stu I* polimorfisme bevestig die lae informatiwiteit wat afgelei kon word uit die heterosigositeitswaardes.

Die nadeel van twee-alleel lokusse is dat PII waardes van hoër as 0.375 nie bereik kan word nie (dit is met frekwensie van 0.5). Die informatiwiteit van RFLP setels in genetiese studies is dus alleen nie hoog genoeg nie. Dit is egter moontlik om die informatiwiteit te verhoog deur hoogs polimorfiese setels soos mikrosatellietloki by die studies te betrek.

4.1.2.3. Die identifikasie van 'n 478 bp delesie in ekson 18 van die LDL reseptor geen

Van die 45 groot delesies en insersies wat in die LDL reseptor geen gerapporteer is teen 1992 (Hobbs et al., 1992) is die DNA-volgorde by die breekpunte in 10 bepaal. Nege het 'n herhalende volgorde van die *Alu* familie by een of beide van die breekpunte gehad. Voorbeelde van sulke mutasies sluit twee delesies en een duplikasie in soos beskryf deur Lehrman et al. (1986; 1987a; 1987b) waar daar in twee gevalle twee *Alu* volgordes betrokke was: Die 7.8 kb delesie het ontstaan na rekombinasie tussen twee *Alu* herhalende volgordes, een in intron 15 en die ander in ekson 18. By die 5 kb

delesie was daar 'n *Alu* volgorde in intron 15 betrokke. Die duplikasie van eksone 2-8 het ontstaan na 'n ongelyke oorkruising tussen homoloë *Alu* volgordes in intron 1 en intron 8. Helen Hobbs het in 1986 'n delesie wat ekson 5 verwyder, gerapporteer. Hierdie delesie het ontstaan a.g.v. homoloë rekombinasie tussen herhalende *Alu* volgordes in intron 4 en in intron 5. 'n Delesie van 4 kb wat ontstaan het tussen twee *Alu* herhalende volgordes wat in dieselfde oriëntasie is, een in intron 12 en die ander een in intron 14, is deur Horsthemke et al. (1987) gerapporteer. Hierdie delesie het ontstaan na 'n ongelyke oorkruising wat tussen twee homoloë chromosome plaasgevind het tydens meiose.

Mees algemeen word die twee *Alu* herhalings wat betrokke is by die rekombinasie in dieselfde oriëntasie aangetref (Hobbs et al., 1990). In hierdie gevalle word daar aangeneem dat homologie tussen die *Alu* volgordes lei tot 'n misparing van chromosoom 19 chromatiede gedurende meiose, gevolg deur 'n ongelyke oorkruising wat die volgordes tussenin uitsny.

Alu herhalings is die vernaamste "middel herhalende " DNA volgordes in soogdiere. Hulle word onderskei van ander herhalende volgordes deurdat hulle substrate is vir die *Alu* I restriksie-endonuklease en dit is om hierdie rede dat hulle algemeen as *Alu*-agtige elemente bekend staan. Hierdie volgordes is versprei oor al die chromosome en kom gewoonlik voor in die intergeniese streke en in introns (Jelinek & Schmid, 1982), maar ook soms in die koderende gedeeltes soos in die geval van die LDL reseptor geen. Deur klonering en volgorde bepaling van veelvoudige lede van die *Alu* familie, het

Deininger et al. (1981) 'n konsensusvolgorde afgelei vir 'n tipiese *Alu* herhaling. Elke *Alu* volgorde is min of meer 300 bp lank en word saamgestel uit twee tandemherhalings waarna verwys word as die linkerarm en regterarm, respektiewelik. Die subeenhede het 'n hoë G+C inhoud en word aan mekaar gekoppel met 'n adenienryke koppelstuk. Die volgorde eindig gewoonlik met 'n poli-gadenileerde stert.

Dit blyk dat *Alu* volgordes dikwels direkte herhalings aan weerskante van hulle volgordes het. Uit 'n vergelyking van die strukture wat nege verskillende *Alu* of *Alu*-agtige volgordes van drie verskillende soogdierspesies omring, het Jelinek en Schmid (1982) waargeneem dat die direkte herhalings tussen 7 en 20 bp lank kan wees. Hierdie herhalings is nie gekonserveerd tussen verskillende *Alu* familie-lede nie, maar is uniek aan elke *Alu* volgorde.

Die nukleotiedvolgorde van die gekloneerde cDNA van die LDL reseptor geen dui aan dat die cDNA drie kopieë van 'n *Alu* herhalende volgorde besit (Yamamoto et al., 1984). Die eerste *Alu* volgorde (nukleotiede 3704-3990) besit al die strukturele kenmerke van die *Alu* konsensusvolgorde, naamlik twee nie-perfekte direkte herhalings wat aan weerskante van die *Alu* herhaling voorkom (13 van die 15 nukleotiede is identies), linkerkantse en regterkantse monomeriese eenhede wat 89% en 84% ooreenstemming met die konsensus *Alu* volgorde respektiewelik toon en 'n A-ryke opeenvolging aan die einde. Die tweede *Alu* volgorde (nukleotied 4049-4164) is 'n verkorte 5'-weergawe van die regterkantse monomeriese eenheid van die konsensusvolgorde. Die derde *Alu* herhaling in die LDL reseptor mRNA

(nukleotiede 4283-4465) is saamgestel uit linker- en regterkantse monomeriese eenhede wat 70% en 87% ooreenstemming respektiewelik toon met die konsensusvolgorde. Die derde *Alu* herhaling blyk om nie direkte herhalings aan weerskante van die *Alu* herhaling te hê nie. Dit het wel 'n A-ryke opeenvolging aan die 3'-kant.

In hierdie studie is 'n delesie van 478 bp waargeneem in ekson 18 van een Kleurling FH heterosigoot. By die eerste en derde *Alu* volgordes, wat direk betrokke is by die vorming van die waargenome delesie, is daar by elkeen 'n identiese nukleotiedvolgorde van 34 bp in die linkerarms. Dit is hierdie nukleotiedvolgordes wat waarskynlik 'n sentrale rol gespeel het in die meganisme van die ontstaan van die delesie, aangesien homologe rekombinasie tussen die twee direkte herhalings kon plaasgevind het.

Hierdie delesie het plaasgevind in die 3'-gedeelte van ekson 18 van die LDL reseptor geen waar transkripsie plaasvind, maar nie translasie nie. Die abnormale gedeelte van die mRNA wat geproduseer word, word dus nie getransleer nie, en daar kan dus gespekuleer word dat hierdie delesie nie abnormale reseptore tot gevolg sal hê nie.

Die 478 bp delesie is nie waargeneem in 21 kontrole individue wat geanaliseer is vir die *Nco* I RFLP nie, maar is wel in een FH-1 heterosigoot aangetoon na sifting van 50 hipercholesterolemiese Kleurlinge. Die FH-1 heterosigoot se lipiedwaardes het aangedui dat die pasiënt se fenotipe aan die FH-1 mutasie te wyte is. Dit blyk dus onwaarskynlik te wees dat die 478

bp delesie 'n skadelike mutasie is wat FH veroorsaak in hierdie twee pasiënte, en daarom word dit beskou as 'n skaars variant.

In die meeste gevalle kan voorspel word dat die teenwoordigheid van 'n *A/u* volgorde in 'n transkribeerbare gedeelte sal lei tot vroeë terminasie, aangesien die element verskeie stopkodons, veral in die sin-oriëntasie, besit (Die sin-oriëntasie heers as die poli-geadenileerde stert stroom-af is wat betref die rigting van transkripsie) (Makalowski et al., 1994). Die groot aantal *A/u* volgordes in die mens genoom (910 000 kopieë, Hwu et al., 1986) en die feit dat hierdie volgordes in mRNA getranskribeer word, het die idee laat ontstaan dat hierdie volgordes kan dien as setels vir genoom herrangskikkings (Britton et al., 1988).

4.1.3. TA herhalende volgorde polimorfisme studie

Die prosedure vir die genotipering van die TA polimorfiese merker in ekson 18 (Zuliani & Hobbs, 1990) was vinnig, aangesien dit essensieel slegs twee stappe behels het, nl. amplifikasie en elektroforese. Verder is so min as 10 ng genomiese DNA voldoende vir roetine genotipering (Weber & May, 1989).

'n Polimorfiese informasie inhoud (PII) waarde van 0.7 beteken dat 'n mikrosatelliet hoogs polimorfies is en dat 50% van families in koppelingstudies informatief sal wees. In so 'n geval is die ouers dikwels heterosigoties by die mikrosatellietloкус en kan die segregasie van die allele sonder probleme in die nageslag gevolg word. Die PII waardes van die

kontrole populasie en die FH populasie was onderskeidelik 0.36 en 0.44. Die TA herhalende lokus is dus redelik informatief. Die informatiwiteit kan moontlik verhoog word deur die RFLP setels, veral die *Sma* I setel, met die TA herhalende lokus te kombineer in genetiese koppelingstudies.

Teoreties moet elke alleel van die teiken mikrosatellietopeenvolging 'n enkele band op die denaturerende gel vorm na elektroforese van die PCR-produkte. Selfs in gevalle waar die voorvoerders slegs aan die teikenvolgorde hibridiseer, gee die PCR van mikrosatelliete gewoonlik aanleiding tot "ekstra bande". Drie meganismes is voorgestel om hierdie verskynsel te verklaar: Die eerste twee meganismes het slegs te doen met gevalle waar die produkte intern radio-aktief gemerk word. Die derde meganisme word veral aangetref in gevalle waar 'n enkele 5'-eindgemerkte voorvoerder gebruik is soos in hierdie studie. Dit gee aanleiding tot 'n leer van ekstra bande met 'n twee-nukleotied-spasiëring. Die eenvoudigste manier om hierdie tipe variasie te verduidelik is dat die polimerase ensiem "stotter" by die mikrosatellietlokus gedurende PCR. 'n Addisionele faktor wat aanleiding kan gee tot die vorming van ekstra bande is die gebruik van ou gemerkte voorvoerders of PCR-produkte. Vir die beste resultate moet gemerkte voorvoerders binne 2-3 dae na die kinase-reaksie uitgevoer is, gebruik word, terwyl die PCR-produkte 1-2 dae na sintese geëlektroforeer behoort te word.

4.2. Toekomsvooruitsigte

Sifting vir die FH Afrikaner-1 en -2, en FH Lithuania mutasies gaan in 'n groter Kleurling FH populasie uitgevoer word om die frekwensies van die mutasies in die Kleurlingpopulasie akkuraat te bepaal. In 'n groter FH studie-populasie sal die moontlike voorkoms van die FH-3 mutasie in die Kleurlingpopulasie ook na vore kom.

Die effek wat die FH-Tygerberg mutasie (FH 333) het op die LDL reseptor fenotipe kan bepaal word in velfibroblaste van die pasiënt wat in kultuur aangekweek moet word om vas te stel of normale binding en metabolisering van LDL plaasvind. Setel-spesifieke mutagenese van die mutasie sal 'n bewys kan lewer dat die basisverandering wel FH veroorsaak en nie net 'n geassosieerde polimorfisme is wat saam met die siekte oorgeërf word nie. Die voorkoms van die FH-Tygerberg mutasie moet ook akkuraat bepaal word deur verdere sifting van hiperlipidemiese Kleurlinge vir hierdie mutasie. Sifting kan uitgevoer word deur spesifieke PKR-produkte met die *Hae* III restriksie-endonuklease te verteer.

Wat betref sifting vir die 2.5 kb delesie van eksons 7-8, is die eerste prioriteit om 'n groter FH Kleurling studie-populasie te sif, sodat die frekwensie van die mutasie in die Kleurlingpopulasie akkuraat bepaal kan word. Aangesien die gebruik van radio-aktiewe isotope in standaard Southern-kladtegnieke gevaarlik en duur is, word beplan om meer van nie-radio-aktiewe merking van peilfragmente gebruik te maak in toekomstige studies. 'n Verdere opsie wat

opgevolg gaan word is die gebruik van die PKR om FH pasiënte te ondersoek vir die teenwoordigheid van die 2.5 kb delesie. 'n Probleem wat voorsien word met die PKR-analise is die PKR se onvermoë om fragmente van langer as 3 kb te amplifiseer (Schwarz et al., 1990). Om hierdie beperking te oorkom gaan 4 moontlikhede uitgetoets word: (a) Ponce et al. (1992) het gerapporteer dat suksesvolle amplifikasie van DNA-segmente van tot 6 kb uitgevoer kan word deur gebruik te maak van die sg. Tricine buffer. Hierdie buffer is reeds met sukses gebruik om die 915 bp fragment van ekson 18 te amplifiseer, in teenstelling met PKR met buffers van ander fabrikate wat onsuksesvol was om ekson 18 te amplifiseer. (b) Schwarz et al. (1990) het gevind dat 3 kb en 6.5 kb fragmente, afsonderlik, suksesvol geamplifiseer kan word deur van die "gene 32 protein" van faag T4, wat T4 DNA-polimerase aktiwiteit en akkuraatheid verhoog (Topal & Sinha, 1983), gebruik te maak. (c) Die sg. "Taq extender PCR additive" (Nielson et al., 1994) is 'n verbinding wat ontwerp is om die lengte, opbrengs en betroubaarheid van PKR-produkte te verbeter deur die effektiwiteit van templaatlenging deur Taq DNA-polimerase te verhoog. Dit is aangetoon dat hierdie verbinding moontlik PKR-amplifikasie van moeilike template kan verbeter en dat die opbrengs van template wat tot 10 kb lank is verhoog kan word. (d) Die gebruik van oligonukleotiedvoorvoeders nader aan die delesie-breekpunte kan inligting verskaf wat gebruik kan word vir die sintese van voorvoeders waarmee daar moontlik met meer sukses geamplifiseer kan word.

Die 21 kontrole individue wat tydens die RFLP-studie ondersoek is vir die *Nco*I polimorfisme in ekson 18, asook 'n verdere 50 hiperlipidemiese individue wat vir die 478 bp delesie in ekson 18 gesif is, het nie die delesie getoon nie. Daar word beplan om 'n groter aantal normocholesterolemiese en hiperlipidemiese individue te sif vir die delesie. Genealogiese en haplotipe studies moet uitgevoer word om vas te stel of FH 231, by wie die 478 bp delesie geïdentifiseer is, en FH 1333 met beide die 478 bp delesie en die FH-1 mutasie, 'n gemeenskaplike voorouer het. Direkte DNA volgorde bepaling moet uitgevoer word om te bevestig dat FH 1333 dieselfde delesie as FH 231 het. Haplotipe en familie-studies word beplan om vas te stel wat die delesie oorsprong is.

Daar word beplan om beide RFLP en TA herhalende studies uit te voer met 'n groter aantal FH heterosigote en kontrole individue onderskeidelik. Verdere haplotipe analise en reseptorbindingstudies moet uitgevoer word om die voorspelling te bevestig dat 'n groot proporsie van pasiënte, wat die defektiewe LDL reseptor geen het wat geassosieer is met die skaars *Ava* II alleel, 'n algemene mutasie het en 'n haplotipe deel. Aangesien mutasies by 'n spesifieke lokus gewoonlik gekoppel is aan spesifieke haplotipes sal die volgende stap die karakterisering van die mutasies gekoppel aan die haplotipes wees. Familiestudies moet uitgevoer word om akkuraat vas te stel hoeveel van die 16 moontlike (2^4) haplotipes in die FH populasie voorkom. Sodoende kan die frekwensie van spesifieke haplotipes bepaal word.

In populasies waar meer as 75% van FH gevalle toegeskryf kan word aan die teenwoordigheid van een of 'n paar LDL reseptor geen mutasies, is die molekulêre diagnostiese dienste reeds goed gevestig. Voorbeelde sluit in die Suid-Afrikaanse Afrikaners en die Finlandse populasie (Aalto-Setälä et al., 1989; Kotze et al., 1991). Om hierdie rede word beplan om eksons 1-18 deeglik te ondersoek vir verdere mutasies en polimorfismes in die Kleurlingpopulasie, aangesien slegs 35% van FH gevalle in hierdie studie toegeskryf kon word aan die opgespoorde mutasies. Wanneer die spektrum van geenmutasies wat onderliggend is aan monogeniese hipercholesterolemie in die Kleurlingpasiënte van Suid-Afrika bekend is, kan multipleks-PKR-sifting metodes ontwikkel word om DNA-diagnose van FH koste-effektief uit te voer.

Alhoewel daar sukses behaal is met die mutasie-sifting deur van die enkelstring-konformasie-polimorfisme- en heterodupleks-metodes afsonderlik gebruik te maak, gaan daar gepoog word om geltoestande te ontwerp waarop daar vir beide abnormale enkelstring- en heterodupleksbandpatrone gelyk gesif kan word. 'n 1% kruiskoppeling sal nog steeds in die gels geïnkorporeer word. Indien bestaande sensitiewe siftingstegnieke soos DGGE en CCM, wat beide 'n geskatte opsporing van mutasies van naby aan 100% het, meer koste-effektief en makliker toepasbaar gemaak word, sal van hierdie tegnieke ook gebruik gemaak word in toekomstige studies.

5. GEVOLGTREKKINGS

Die doel van van hierdie studie was onder andere die sifting van die Kleurlingpopulasie vir die FH Afrikaner-1, -2 en -3 mutasies, wat in die Afrikanerpopulasie gesamentlik verantwoordelik is vir ongeveer 90% van FH gevalle, om die voorkoms van hierdie mutasies in die Kleurlinge te bepaal. Hierdie sifting is suksesvol met die AIMS-PKR uitgevoer en gee 'n aanduiding van die verspreiding van hierdie mutasies in die Kleurlinge. Die AIMS-PKR metode was dus 'n vinnige en betroubare metode om te gebruik in hierdie sifting. Die FH-1 en FH-2 mutasies is waargeneem in 26% van die FH heterosigote wat getoets is. Die lae voorkoms van die mutasies kan die gevolg wees van die klein siftingspopulasie (31 individue). Die FH-1 mutasie, wat in 60% van Afrikaners met FH voorkom, het 'n groter kans vir oordrag tussen die Afrikaners en die Kleurlinge as die ander twee FH-Afrikanermutasies. Haplotipe analise het aangedui dat hierdie mutasie óf vanaf die Afrikaners na die Kleurlinge oorgedra is, óf vanaf Britse voorouers direk na die Kleurlinge. Beide van hierdie moontlikhede kon egter plaasgevind het. Die feit dat die FH-1 mutasie ook in die hiperlipidemiese groep aangetref is, bevestig ook dat kliniese identifikasie van FH nie 'n betroubare diagnostiese metode voorsien nie. Die FH-2 mutasie se voorkoms is heeltemal binne perke van wat verwag kan word, aangesien hierdie mutasie waarskynlik onafhanklik ontstaan het soos aangetoon deur die haplotipe analise. Die feit dat die FH-3 mutasie glad nie gesien is nie, kan

toegeskryf word aan die mutasie se lae voorkoms in die Afrikaners, sodat die kans kleiner is vir hierdie mutasie om oorgedra te word.

Die 3 bp delesie (FH-Lithuania) en 'n nuwe mutasie wat nog nie voorheen beskryf is nie, nl. die FH-Tygerberg mutasie, is in onderskeidelik 4.3% en 4.5% van die FH heterosigote gevind. Die FH-Lithuania mutasie het sy oorsprong in die Ashkenazi Jode van Lithuania en die haplotipe analise wat in hierdie studie uitgevoer is, het daarop gedui dat die Kleurlinge moontlik hierdie mutasie vanaf die Jode in Suid-Afrika kon oorgeërf het. Die FH-Tygerberg mutasie het heel moontlik sy ontstaan in Suid-Afrika gehad, omdat daar nog nie voorheen so 'n mutasie beskryf is nie. Daar word algemeen aangeneem dat 'n nuwe mutasie soos die FH-Tygerberg mutasie baie meer onlangs plaasgevind het as die algemene klein variasies in die DNA-opeenvolging wat genetiese polimorfismes laat ontstaan (Orkin & Kazazian, 1984).

In 31 FH heterosigote het LDL reseptor mutasies dus 35% van die FH gevalle verklaar. Dit benadruk die feit dat die meerderheid van mutasies wat FH in die Kleurlinge veroorsaak nog onbekend is en dalk moontlik in die ander eksone van die geen geleë is. Hierdie voorkomsbepalingstudies kan as 'n basis beskou word vir verdere studies met 'n groter FH populasie om die aanvanklike aanduidings te bevestig. Die opgespoorde mutasies is egter reeds kandidate vir 'n molekulêre diens vir die Kleurlinge. 'n Diagnostiese diens kan reeds aangebied word vir die Kleurlinge, deur van die AIMS-PKR metode gebruik te maak om te sif vir die FH-Afrikaner mutasies en die FH-

Lithuania mutasie deur heterodupleks-analise van die interne kontrole ekson 4 PKR-produkte. Die FH-Tygerberg mutasie kan vinnig gediagnoseer word met PKR en restriksie-endonuklease vertering van die interne kontrole fragment deur van die *Hae* III restriksie-endonuklease gebruik te maak, of kan ook toekomstig ingesluit word in die AIMS-PKR.

Aangesien kliniese varieerbaarheid tussen FH heterosigote met dieselfde FH-geassosieerde mutasie waargeneem is, veral wat betref totale cholesterolvlakke, is dit 'n aanduiding dat molekulêre diagnose in die Kleurling FH populasie 'n beter diagnose van FH kan voorsien.

Die ESKP- en heteroduplekssiftingmetodes kan verder onafhanklik gebruik word vir die sifting vir nuwe en bekende mutasies, aangesien hulle saam 'n suksesvolle kombinasie was. Uit die resultate het dit geblyk dat ESKP-analise met 10% poli-akrielamiedgels, wat 'n kruiskoppelingsverhouding van 1% het, suksesvol gebruik kan word om nuwe mutasies op te spoor. Ureum moet egter óf uitgelaat word uit die gels, óf teen 'n persentasie van 5-10% ingesluit word. Temperature van tussen 4 en 8°C blyk om verder meer suksesvol te wees as hoër temperature, veral 15°C en hoër. Dit blyk dat die ESKP-tegniek meer sensitief is as die heterodupleksmetode, aangesien die FH-Tygerberg mutasie nie op die heterodupleksgels waargeneem is nie, maar die mutasie kon wel op die ESKP gels (met en sonder ureum) opgespoor word.

Die 2.5 kb delesie van eksons 7 en 8 van die LDL reseptor geen, is nie tydens hierdie studie opgespoor nie. Dit kan waarskynlik toegeskryf word aan die klein studie-populasie of dat die frekwensie van die mutasie baie laag is in die Kleurlingpopulasie.

Die demonstrasie van 13 uit die moontlike 256 genotipes in die kontrole en FH populasies is die gevolg van koppeling- χ^2 ewigwrig tussen die 4 polimorfiese merkers wat in hierdie studie bestudeer is.

Die RFLP studie en die TA-herhalende-dinukleotied studies was betekenisvol. Met die RFLP studie is 'n statisties beduidende verhoging in die skaars alleel van die *Ava* II polimorfisme in die Kleurlinge waargeneem. Dit is dus 'n aanduiding van 'n onderliggende mutasie wat nog nie in die Kleurlinge opgespoor is nie en dui op populasie-assosiasie van die alleel met 'n geen wat FH veroorsaak. Die TA-herhalende-dinukleotied studies het getoon dat hierdie lokus redelik informatief sal wees in genetiese koppelingstudies. Die heterosigositeit- en PII waardes wat vir die vier RFLP setels bereken is, het daarop gedui dat die *Sma* I setel die informatiefste sal wees in genetiese studies, gevolg deur die *Ava* II en *Nco* I setels. Die *Stu* I polimorfiese setel het die laagste polimorfisme en dus informatiwiteit getoon. Daar word aanbeveel dat hierdie setel in toekomstige studies eerder vervang moet word met 'n setel wat meer polimorfies is. Die meer informatiewe RFLP setels (*Sma* I, *Ava* II en *Nco* I) kan gesamentlik met die TA-herhalende-dinukleotiedloкус, wat ook redelik informatief is, gebruik word in familiestudies om 'n diagnose van FH te verkry in gevalle waar die direkte molekulêre

diagnose van FH, met die aantoon van FH-verwante mutasies, nie moontlik is nie.

Die 478 bp delesie wat in twee FH heterosigote waargeneem is in ekson 18 van die LDL reseptor geen, kan as 'n polimorfisme beskou word en kan in merkerstudies gebruik word. Hierdie RFLP verwyder die *Nco* I restriksie setel in ekson 18. Die ontdekking van die mutasie bevestig vroeë studies van die algemene voorkoms van mutasies by *Alu* herhalende volgordes.

Die molekulêre identifikasie van die FH-Afrikaner-1, -2, FH-Lithuania en FH-Tygerberg mutasies in die Kleurlingpopulasie kan dus gebruik word om 'n direkte diagnose van FH in hierdie populasie-groep te verseker in 'n berekende 35% van Kleurlinge wat op kliniese gronde as FH gediagnoseer is.

Haplotipe studies met RFLP setels wat gekombineer word met die TA-herhalende-dinukleotied setel in ekson 18, kan gebruik word om die teenwoordigheid van 'n mutasie indirek aan te dui in geaffekteerde families.

Uit die studie is dit dus duidelik dat 'n beter diagnostiese diens aan FH Kleurlinge met 'n hoë risiko vir die ontwikkeling van koronêre hartsiekte gelewer kan word.

6. VERWYSINGS

- Aalto-Setälä K, Helve E, Kovanen PT, Kontula K. 1989. Finnish type of low density lipoprotein receptor gene mutation (FH-Helsinki) deletes exons encoding the carboxy-terminal part of the receptor and creates an internalization-defective phenotype. *J Clin Invest*; **84**: 499-505.
- Barker D, Schafer M, White R. 1984. Restriction sites containing CpG show a higher frequency of polymorphism in human DNA. *Cell*; **36**: 131-138.
- Benatar SR. 1986. Medicine and health care in South Africa. *N Engl J Med*; **313**: 527-532.
- Botha MC, Beighton P. 1983. Inherited disorder in the Afrikaner population of South Africa: Part I. Historical and demographic background, cardiovascular, neurological, metabolic and intestinal conditions. *S Afr Med J*; **64**: 609-612; 664-667.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*; **32**: 314-331.
- Britton RJ, Baron WF, Stout DB, Davidson EH. 1988. Sources and evolution of human *Alu* repeated sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*; **85**: 4770-4774.
- Brown MS, Goldstein JL. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*; **232**: 34-47.
- Chakravarti A, Phillips JA III, Mellits KH, Buetow KH, Seeburg PH. 1984. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium suggest independent origins of the human growth hormone gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA*; **81**: 6085-6089.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*; **16**: 11141-11156.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT. 1990. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innes M, Gelfand D, Sninsky J, White T, eds), p 272-281. Academic Press, Orlando, FL.
- Chen W-J, Goldstein JL, Brown MS. 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*; **265**: 3116-3123.

- Cooper DN, Schmidtke J. 1984. DNA restriction fragment length polymorphisms and heterozygosity in the human genome. *Hum Genet*; **66**: 1-16.
- Cooper DN, Smith BA, Cooke HJ, Niemann S, Schmidtke J. 1985. An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet*; **69**: 201-205.
- Cooper DN, Youssoufian H. 1988. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet*; **78**: 151-155.
- Cotton RGH, Rodrigues NR, Campbell DR. 1988. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*; **85**: 4397-4401.
- Cuthbert JA, East CA, Bilheimer DW, Lipsky PE. 1986. Detection of familial hypercholesterolemia by assaying functional low-density-lipoprotein receptors on lymphocytes. *N Engl J Med*; **314**: 879-883.
- Davis CG, Elhammer A, Russell DW, Schneider WJ, Kornfeld S, Brown MS, Goldstein JL. 1986a. Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J Biol Chem*; **261**: 2828-2838.
- Davis CG, Lehrman MA, Russell DW, Anderson RGW, Brown MS, Goldstein JL. 1986b. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: Amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell*; **45**: 15-24.
- Davis CG, Goldstein JL, Südhof TC, Anderson RGW, Russell DW, Brown MS. 1987a. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*; **326**: 760-765.
- Davis CG, van Driel IR, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. 1987b. The low density lipoprotein receptor. Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis. *J Biol Chem*; **262**: 4075-4082.
- Dawber TR. 1980. *The Framingham Study*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Defesche JC, Lansberg PJ. 1993. *The molecular basis and treatment of familial hypercholesterolemia (PhD Thesis)*. Thesis Publishers, Amsterdam.

- Deininger PL, Jolly DJ, Rubin CM, Friedmann T, Schmid CW. 1981. Base sequence studies of 300 nucleotide renatured repeated human DNA clones. *J Mol Biol*; **151**: 17-33.
- Gertler MM, White PD. 1954. *Coronary Heart Disease in Young Adults: A Multidisciplinary Study*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Gilbert W. 1978. Why genes in pieces ? *Nature*; **271**: 501
- Golding GB. 1984. The sampling distribution of linkage disequilibrium. *Genetics*; **108**: 257-274.
- Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. 1973. Hyperlipidemia in coronary heart disease, II: Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest*; **52**: 1544-1568.
- Goldstein JL, Brown MS. 1983. Familial hypercholesterolemia. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Chapter 33. Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, eds. New York: McGraw-Hill, p 672-712.
- Goldstein JL, Brown MS. 1989. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th ed. New York: McGraw-Hill, p 1215-50.
- Goldstein JL, Brown MS. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*; **343**: 425-430.
- Grundy SM. 1986. Cholesterol and coronary heart disease : a new era. *JAMA*; **256**: 2849-2858.
- Gudnason V, King-Underwood L, Seed M, Sun X-M, Soutar AK, Humphries SE. 1993. Identification of recurrent and novel mutations in exon 4 of the LDL receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia in the United Kingdom. *Arterioscler Thromb*; **13**: 56-63.
- Hayashi K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl*; **1**:34-38.
- Henderson HE, Berger GMB, Marais AD. 1988. A new LDL receptor gene deletion mutation in the South African population. *Hum Genet*; **80**: 371-374.
- Hill AVS, Wainscoat JS. 1986. The evolution of the α - and β -globin gene clusters in human populations. *Hum Genet*; **74**: 16-23.

- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. 1986. Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*; **261**: 13114-13120.
- Hobbs HH, Esser V, Russell DW. 1987. Ava II polymorphism in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res*; **15**: 379.
- Hobbs HH, Leitersdorf E, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. 1988. Multiple *crr* mutations in familial hypercholesterolemia: evidence for 13 alleles, including four deletions. *J Clin Invest*; **81**: 909-917.
- Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. 1990. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet*; **24**: 133-170.
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia: mutation update. *Hum Mutat*; **1**: 445-466.
- Horsthemke B, Beisiegel U, Dunning A, Havinga JR, Williamson R, Humphries S. 1987. Unequal crossing-over between two *Alu*-repetitive DNA sequences in the low-density-lipoprotein-receptor gene. A possible mechanism for the defect in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Biochem*; **164**: 77-81.
- Hwu HR, Roberts JW, Davidson EH, Britton RJ. 1986. Insertion and/or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*; **83**: 3875-3879.
- Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM. 1987. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA*; **84**: 6919-6923.
- Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, et al. 1990. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res*; **31**: 1337-1349.
- Jeffreys AJ, Flavell RA, van der Berg FM. 1977. Theoretical analysis of (dA-dT) cluster distributions in DNA. *J Mol Biol*; **115**: 735-741.
- Jelinek WR, Schmid CW. 1982. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu Rev Biochem*; **51**: 813-44.
- Jensen LG, Jensen HK, Kjeldsen M, Gerdes LU, Hansen PS, Færgeman O, Kolvraa S, Bolund L, Gregersen N. 1994. A new, highly informative polymorphism in intron 7 of the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene. *Clin Genet*; **45**: 52-53.

- Kajinami K, Mabuchi H, Inazu A, Fujita H, Koizumi J, Takeda R, Matsue T, Kibata M. 1990. Novel gene mutations at the low density lipoprotein receptor locus: FH-Kanazawa and FH-Okayama. *J Intern Med*; **227**: 247-251.
- Keen J, Lester D, Inglehearn C, Curtis A, Bhattacharya S. 1991. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on hydrolink gels. *Trends Genet*; **7**: 5.
- Keys A. 1980. Seven countries : A multivariate analysis of death and coronary heart disease. Harvard University Press, Cambridge, Mass; p1-381.
- Kontula K, Koivisto U-M, Koivisto P, Turtola H. 1992. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia: common and rare mutations of the low density lipoprotein receptor gene. *Ann Med*; **24**: 363-367.
- Kotze MJ, Retief AE, Brink PA, Weich HFH. 1986. A DNA polymorphism in the human low-density lipoprotein receptor gene. *S Afr Med J*; **70**: 77-79.
- Kotze MJ, Langenhoven E, Retief AE, Steyn K, Marais MP, Grobelaar JJ, Oosthuizen CJJ, Weich HFH, Benadé AJS. 1987a. Haplotype associations of three DNA polymorphisms at the human low density lipoprotein receptor gene locus in familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet*; **24**: 750-755.
- Kotze MJ, Langenhoven E, Dietzsch E, Retief AE. 1987b. A RFLP associated with the low-density lipoprotein receptor gene (LDLR). *Nucleic Acids Res*; **15**: 376.
- Kotze MJ, Langenhoven E, Retief AE, Seftel HC, Henderson HE, Weich HFH. 1989a. Haplotypes identified by 10 DNA restriction fragment length polymorphisms at the human low density lipoprotein receptor gene locus. *J Med Genet*; **26**: 255-259.
- Kotze MJ, Langenhoven E, Warnich L, du Plessis L, Marx MP, Oosthuizen CJJ, Retief AE. 1989b. The identification of two low-density lipoprotein receptor gene mutations in South African familial hypercholesterolaemia. *S Afr Med J*; **76**: 399-401.
- Kotze MJ, Warnich L, Langenhoven E, du Plessis L, Retief AE. 1990. An exon 4 mutation identified in the majority of South African familial hypercholesterolaemics. *J Med Genet*; **27**: 298-302.
- Kotze MJ, Langenhoven E, Warnich L, du Plessis L, Retief AE. 1991. The molecular basis and diagnosis of familial hypercholesterolaemia in South African Afrikaners. *Ann Hum Genet*; **55**: 115-121.

- Kotze MJ, Langenhoven E, Kriek JA, Oosthuizen CJJ, Retief AE. 1992. DNA screening of hyperlipidemic Afrikaners for familial hypercholesterolemia. *Clin Genet*; **42**: 43-46.
- Kotze MJ, de Villiers WJS, Steyn K, Kriek JA, Marais AD, Langenhoven E, Herbert JS, Graadt van Roggen JF, van der Westhuyzen DR, Coetzee GA. 1993. Phenotypic variation among familial hypercholesterolemics heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations. *Arterioscler Thromb*; **13**: 1460-1468.
- Kotze MJ, Langenhoven E, Theart L, Marx MP, Oosthuizen CJJ. 1994. Report on a molecular diagnostic service for familial hypercholesterolemia in Afrikaners. *Genet Couns*; **5**: 15-22.
- Kotze MJ, Peeters AV, Langenhoven E, Wauters JG, Van Gaal LF. Phenotypic expression and frequency of familial defective apolipoprotein B-100 in Belgian hypercholesterolemics. In druk (1). *Atherosclerosis*.
- Kotze MJ, Theart L, Peeters A, Langenhoven E. A de novo duplication in the low density lipoprotein receptor gene. In druk (2). *Hum Mutat*.
- Krawczak M, Cooper DN. 1991. Gene deletions causing human genetic disease: Mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet*; **86**: 425-441.
- Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, Breg WR, Jones HW, Jr., Rary JM. 1977. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci USA*; **74**: 1245-1249.
- Langenhoven E. 1989. Die molekulêre karakterisering van genomiese DNS fragmente van die LDL-reseptor geenlokus. MSc Thesis, Stellenbosch.
- Langlois S, Kastelein JJP, Hayden MR. 1988. Characterization of six partial deletions in the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene causing Familial Hypercholesterolemia (FH). *Am J Hum Genet*; **43**: 060-068.
- Lehrman MA, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW, Schneider WJ. 1985a. Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain. *Cell*; **41**: 735-743.
- Lehrman MA, Schneider WJ, Südhof TC, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. 1985b. Mutation in LDL receptor : *Alu-Alu* recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science*; **227**: 140-146.

- Lehrman MA, Russell DW, Goldstein JL, Brown MS. 1986. Exon-*Alu* recombination deletes 5 kilobases from the low density lipoprotein receptor gene, producing a null phenotype in familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA*; **83**: 3679-3683.
- Lehrman MA, Russell DW, Goldstein JL, Brown MS. 1987a. *Alu-Alu* recombination deletes splice acceptor sites and produces secreted low density lipoprotein receptor in a subject with familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*; **262**: 3354-3361.
- Lehrman MA, Goldstein JL, Russell DW, Brown MS. 1987b. Duplication of seven exons in LDL receptor gene caused by *Alu-Alu* recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. *Cell*; **48**: 827-835.
- Leitersdorf E, van der Westhuyzen DR, Coetzee GA, Hobbs HH. 1989. Two common low density lipoprotein receptor gene mutations cause familial hypercholesterolemia in Afrikaners. *J Clin Invest*; **84**: 954-961.
- Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J, Hobbs HH. 1990. Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin Invest*; **85**: 1014-1023.
- Lewontin RC. 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, New York.
- Lindgren V, Luskey KL, Russell DW, Francke U. 1985. Human genes involved in cholesterol metabolism: Chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes. *Proc Natl Acad USA*; **82**: 8567-8571.
- Litt M, Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*; **44**: 397-401.
- Lu YH, Nègre S. 1993. Use of glycerol for enhanced efficiency and specificity of PCR amplification. *Trends Genet*; **9**: 297.
- Makalowski W, Mitchell GA, Labuda D. 1994. *Alu* sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability. *Trends Genet*; **10**: 188-193.
- Marazziti D, Eggertsen G, Fey GH, Stanley KK. 1988. Relationships between the gene and protein structure in human complement component C9. *Biochemistry*; **27**: 6529-6534.
- Mashiyama S, Sekiya T, Hayashi K. 1990. Screening of multiple DNA samples for detection of sequence changes. *Technique*; **2**: 304-306.

- Maxam AM, Gilbert W. 1980. Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol*; **65**: 499-560.
- Meiner V, Landsberger D, Berkman N, Reshef A, Segal P, Seftel HC, van der Westhuyzen DR, Jeenah MS, Coetzee GA, Leitersdorf E. 1991. A common Lithuanian mutation causing familial hypercholesterolemia in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet*; **49**: 443-449.
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Saiki RK, Horn GT, Erlich H. 1986. Specific amplification of DNA in vitro. *Cold Spring Harbour Symp. Quant Biol*; **51**: 263.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*; **155**: 335-350.
- Myers RM, Larin Z, Maniatis T. 1985. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA : DNA duplexes. *Science*; **230**: 1242-1246.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*; **17**: 2503-2516.
- Nielson KB, Schoettlin W, Bauer JC, Mathur E. 1994. *Taq* extender PCR additive for improved length, yield and reliability of PCR products. *Strategies Mol Biol*; **7**: 27.
- Nikkilä EA, Aro A. 1973. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart-disease. *Lancet*; **i**: 954-959.
- Nurse GT, Weiner JS, Jenkins T. 1985. *The peoples of Southern Africa and their affinities*. Clarendon Press, Oxford.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. 1989a. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*; **86**: 2766-2770.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. 1989b. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*; **5**: 874-879.
- Orkin SH, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJV. 1982. Linkage of β -thalassaemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. *Nature*; **296**: 627-631.

- Orkin SH, Kazazian HH, Jr. 1984. The mutation and polymorphism of the beta-globin gene and its surrounding DNA. *Ann Rev Genet*; **18**: 131-171.
- Pastan I, Willingham MC. 1983. Receptor-mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the Golgi. *TIBS*; July: 250-254.
- Patterson D, Slack J. 1972. Lipid abnormalities in male and female survivors of myocardial infarction and their first-degree relatives. *Lancet*; i: 393-399.
- Peeters AV, Kotze MJ. Improved heteroduplex detection of single base substitutions in PCR-amplified DNA. In druk. *PCR Methods Appl*.
- Perry DJ, Carrell PW. 1992. Hydrolink gels: rapid and simple approach to the detection of DNA mutations in thromboembolic disease. *J Clin Pathol*; **45**: 158-163.
- Picci L, Anglani F, Scarpa M, Zacchello F. 1992. Screening for cystic fibrosis gene mutations by multiplex DNA amplification. *Hum Genet*; **88**: 552-556.
- Ponce MR, Micol JL. 1992. PCR amplification of long DNA fragments. *Nucleic Acids Res*; **20**: 623.
- Pullinger CR, Hennessy LK, Love JA, Frost PH, Mendel CM, Liu W, Malloy MJ, Kane JP. 1993. Familial ligand-defective apolipoprotein B: Identification of a new mutation that decreases receptor LDL affinity binding. *Circulation*; **88**: I-322.
- Prior TW, et al. 1993. A missense mutation in the dystrophin gene in a Duchenne muscular dystrophy patient. *Nat Genet*; **4**: 357-360.
- Rossouw JE, Jooste PL, Steyn K, Benadé AJS. 1985. Serum total and high-density lipoprotein cholesterol - reference values obtained in the Coronary Risk Factor Study baseline survey. *S Afr Med J*; **67**: 533-538.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*; **230**: 1350-1354.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*; **239**: 487-491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*; **74**: 5463-5467.
- Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*; **233**: 1076-1078.
- Schwarz K, Hansen-Hagge T, Bartram C. 1990. Improved yields of long PCR products using gene 32 protein. *Nucleic Acids Res*; **18**: 1079.
- Seedat YK, Seedat MA. 1982. An inter-racial study of the prevalence of hypertension in an urban South African population. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; **76**: 62-68.
- Seftel HC, Baker SG, Sandler MP, Forman MB, Joffe BI, Mendelsohn D, Jenkins T, Mieny CJ. 1980. A host of hypercholesterolaemic homozygotes in South Africa. *B M J*; **281**: 633-636.
- Seftel HC, Baker SG, Jenkins T, Mendelsohn D. 1989. Prevalence of familial hypercholesterolemia in Johannesburg Jews. *Am J Med Genet*; **34**: 545-547.
- Sheffield VC, Cox DR, Lehrman LS, Myers RM. 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA*; **86**: 232-236.
- Skolnick MH, Willard HF, Menlove LA. 1984. Report of the committee on human gene mapping by recombinant DNA techniques. *Cytogenet Cell Genet*; **37**: 210-273.
- Slack J, Evans KA. 1966. The increased risk of death from ischaemic heart disease in first degree relatives of 121 men and 96 women with ischaemic heart disease. *J Med Genet*; **3**: 239.
- Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. 1990. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*; **265**: 2306-2310.
- Soria LF, Ludwig EH, Clarke HRG, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. 1989. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA*; **86**: 587-591.

- Soutar AK, Knight BL, Patel DD. 1989. Identification of a point mutation in growth factor repeat C of the low density lipoprotein-receptor gene in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia that affects ligand binding and intracellular movement of receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*; **86**: 4166-70.
- Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*; **98**: 503-517.
- Steyn K, Jooste PL, Langenhoven ML, Benadé AJS, Rossouw JE, Steyn M, Jordaan PCJ, Parry CDH. 1985. Coronary risk factors in the coloured population of the Cape Peninsula. *S Afr Med J*; **67**: 619-625.
- Steyn K, Jooste PL, Fourie JM, Parry CDH, Rossouw JE. 1986. Hypertension in the coloured population of the Cape Peninsula. *S Afr Med J*; **69**: 165-169.
- Steyn K, Jooste PL, Langenhoven ML, Rossouw JE, Steyn M, Jordaan PCJ, Joubert G. 1987a. Smoking patterns in the coloured population of the Cape Peninsula (CRISIC I study). *S Afr Med J*; **71**: 145-148.
- Steyn K, Benadé AJS, Langenhoven ML, Joubert G, Rossouw JE. 1987b. Hypercholesterolaemia in the coloured population of the Cape Peninsula (CRISIC I study). *S Afr Med J*; **71**: 483-486.
- Steyn K, Fourie J, Benadé AJS, Rossouw JE, Langenhoven ML, Joubert G, Chalton DO. 1989. Factors associated with high-density lipoprotein cholesterol in a population with high HDL cholesterol levels. *Atherosclerosis*; **9**: 390-397.
- Steyn K, Rossouw JE, Joubert G. 1990a. The coexistence of major coronary heart disease risk factors in the coloured population of the Cape Peninsula (CRISIC I study). *S Afr Med J*; **78**: 61-63.
- Steyn K, Fourie J. 1990b. Requirements of a coronary heart disease risk factor intervention programme for the coloured population of the Cape Peninsula. *S Afr Med J*. **78**: 78-81.
- Südhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. 1985. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*; **228**: 815-822.
- Sun X-M, Webb JC, Gudnason V, Humphries S, Seed M, Thompson GR, Knight BL, Soutar AK. 1992. Characterization of deletions in the LDL receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia in the United Kingdom. *Arterioscler Thromb*; **12**: 762-770.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*, **17**: 6463-6471.

- Theal GM. 1922. History of Southern Africa, vol. 4, p. 357, C. Struik, Cape Town.
- Theart L, Kotze MJ, Langenhoven E, Loubser O, Peeters AV, Lintott CJ, Scott RS. Screening for mutations in exon 4 of the low density lipoprotein receptor gene: identification of a novel deletion-mutation. In druk. *J Med Genet*.
- Theophilus BDM, Latham T, Grabowski GA, Smith FI. 1989. Comparison of RNase A, a chemical cleavage and GC clamped denaturing gradient gel electrophoresis for the detection of mutations in exon 9 of the human acid B-glucosidase gene. *Nucleic Acids Res*; **17**: 7707-7722.
- Thomas CB, Cohen B.H. 1955 The familial occurrence of hypertension and coronary heart disease, with observations concerning obesity and diabetes. *Ann Intern Med*; **42**: 239.
- Thompson GR, Lowenthal R, Myant NB. 1975. Plasma exchange in the management of homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet*; **i**: 1208-11.
- Top B, Uitterlinden AG, van der Zee A, Kastelein JJP, Gevers Leuven JA, Havekes LM, Frants RR. 1992. Absence of mutations in the promotor region of the low density lipoprotein receptor gene in a large number of familial hypercholesterolaemia patients as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Genet*; **89**: 561-565.
- Total MD, Sinha NK. 1983. Products of bacteriophage T4 genes 32 and 45 improve the accuracy of DNA replication in vitro. *J Biol Chem*; **258**: 12274-12279.
- Ugozzoli L, Wallace RB. 1992. Application of an allele-specific polymerase chain reaction to the direct determination of ABO blood group genotypes. *Genomics*; **12**: 670-674.
- Utermann G. 1990. Coronary heart disease. In: Emery AEH, Rimo DL (eds). Principles and practice of medical genetics, Vol. 2. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York; p 1239-1262.
- Van Roggen FG, van der Westhuyzen DR, Marais AD, Gevers W, Coetzee GA. 1991. Low density lipoprotein receptor founder mutations in Afrikaner familial hypercholesterolaemic patients: a comparison of two geographical areas. *Hum Genet*; **88**: 204-208.
- Vandenplas S, Wiid I, Grobler-Rabie A, Brebner K, Ricketts M, Wallis G, Bester A, Boyd C, Mathew C. 1984. Blot hybridisation analysis of genomic DNA. *J Med Genet*; **21**: 164-172.

- Vogel F, Motulsky AG. 1986. Human Genetics, 2nd edn. Springer Berlin Heidelberg New York.
- Wainscoat JS, Bell JI, Thein SL, Higgs DR, Sarjeant GR Peto TEA, Weatherall DJ. 1983. Multiple origins of the sickle mutation: evidence from the β -globin gene cluster polymorphisms. *Mol Biol Med*; **1**: 191-197.
- Weber JL and May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*; **44**: 388-396.
- White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M. 1992. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics*; **12**: 301-306.
- Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell, DW. 1984. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple *A*/*u* sequences in its mRNA. *Cell*; **39**: 27-38.
- Yap EPH, McGee JO'D. 1992. Nonisotopic SSCP detection in PCR products by ethidium bromide staining. *Trends Genet*; **8**: 49.
- Zuliani G and Hobbs H. 1990. Dinucleotide repeat polymorphism at the 3' end of the LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res*; **18**: 4300.